

CAROLINA MATIAS DINIZ

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA INIBIÇÃO
DA CALICREÍNA TECIDUAL DO RATO,
ISOLADA DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR,
COM A APROTININA**

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2008

CAROLINA MATIAS DINIZ

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA INIBIÇÃO
DA CALICREÍNA TECIDUAL DO RATO,
ISOLADA DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR,
COM A APROTININA**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2008

MESTRANDA: CAROLINA MATIAS DINIZ

ORIENTADOR: PROF. DR. AMINTAS FABIANO DE SOUZA FIGUEIREDO

ÁREA DO CONHECIMENTO (CNPq/CAPES)
2.08.05.00-4 – Enzimologia

Instituições participantes:

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia –
UFMG

Departamento de Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas –
UFMG

"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e a força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre. "
(Louis L. Amour)

Dedico este trabalho aos meus pais, Justino e Socorro, por sempre me apoiarem incondicionalmente nas minhas decisões e por me incentivarem a alcançar com confiança os meus objetivos. Obrigada por serem exemplos de obstáculos, lutas, superações e vitórias.

Dedico a minha irmã, Anna Beatriz, pelo companheirismo, torcida e atenção dispensada em todos os momentos desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado. Dando-me força, sabedoria, paciência, saúde e serenidade para a realização deste trabalho.

Ao meu pai pelo apoio imensurável e pelas palavras dispensadas em todos os momentos. Por mais esta vitória.

A minha mãe pelo exemplo de força e coragem. Pelo amor incondicional.

A minha irmã por ser a minha fonte de inspiração e por acreditar em mim. Por compartilhar comigo os planos e os sonhos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo, pelo exemplo de competência e seriedade, incentivando-me a buscar o conhecimento com critério e metodologia. Agradeço pela orientação, paciência e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Matos Santoro pela contribuição generosa na etapa mais importante deste trabalho.

À Dra. Luciana Pereira Xavier pela participação neste trabalho, em especial pela análise feita, imprescindível para fundamentar o meu trabalho.

Ao Professor Dr. Márcio de Matos Coelho pelo empenho e contribuição para a qualidade do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Aos demais professores da Faculdade de Farmácia, em especial aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo apoio, carinho e ensinamentos.

Ao Professor Geraldo Tadeu Generoso pela amizade, atenção e carinho.

Às Professoras Dras. Marinez de Oliveira Sousa e Maria das Graças Carvalho pela contribuição valiosa na minha formação profissional, pelo apoio e carinho sempre dispensados.

Ao Professor Dr. Henrique Pimenta pelo incentivo constante no decorrer desta etapa.

A Cláudia Morais Vivas pela amizade adquirida, pela grande colaboração no decorrer deste trabalho, ensinamentos e paciência ao longo desta jornada.

Às técnicas do laboratório de Bioquímica, Eunice e Marisa, pela colaboração e descontração durante o trabalho.

As secretárias do PPGCF, Rosemary e Jurema, pela simpatia e atenção, sempre dispostas a solucionar as dúvidas e problemas.

Às amigas Luiza Vilela Portugal e Sabrina Guimarães Paiva por acompanharem o passo-a-passo deste trabalho e por serem parte integral da minha vida em Belo Horizonte.

Aos amigos do mestrado, Fernandinho, Natalia e Josiane, por compartilharem as dúvidas e anseios existentes no decorrer desta etapa.

Aos colegas de trabalho do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais por colaborarem com o meu aprendizado ao longo destes anos.

Aos alunos do 9º período da Faculdade de Farmácia pelas dúvidas e incentivo ao aprimoramento.

Às amigas capixabas, Michelle, Marina, Janaína e Camilla pela torcida e por fazerem parte da minha vida, mesmo com a distância.

Ao Valdir, Nelcila e Ariella pela amizade e por torcerem por mim.

Aos demais familiares, amigos e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização e finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE QUADROS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	19
1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	21
1.1 Serino-proteases.....	22
1.2 Sistema Calicreína-cinina.....	23
1.3 Calicreínas.....	23
1.4 Cininogênios.....	34
1.5 Cininas.....	36
1.6 Cininases.....	37
1.7 Aprotinina.....	37
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	43
3.1 Amostra.....	44
3.2 Metodologia Laboratorial.....	45
3.2.1 Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato (rK1).....	45
3.2.2 Preparação do padrão de albumina de soro bovino (BS) a 0,5 mg/mL.....	48
3.2.3 Determinação da concentração de proteínas.....	48
3.3 Purificação da calicreína tecidual do rato.....	52
3.3.1 Preparação da amostra.....	52
3.3.2 Preparação do extrato bruto.....	53
3.3.3 Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose.....	54
3.3.4 Preparação da coluna de Sepharose-aprotiniana.....	55

3.3.5 Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.....	56
3.3.6 Cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.....	58
3.4 Métodos para a avaliação da pureza e determinação do peso molecular aparente da rK1.....	59
3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
3.4.2 Espectrometria de massa.....	61
3.5 Caracterização cinética da calicreína tecidual do rato.....	62
3.5.1 Titulação da rK1, em centro ativo, com a aprotinina.....	62
3.5.2 Preparação das soluções de aprotinina.....	63
3.5.3 Preparação das soluções do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.....	64
3.5.4 Determinação da concentração real do substrato.....	64
3.5.5 Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, na ausência e na presença da aprotinina.....	66
3.5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	69
4 RESULTADOS.....	73
4.1 Purificação da calicreína tecidual do rato.....	74
4.2 Critérios de pureza e peso molecular.....	81
4.3 Titulação da rK1, em centro ativo, com a aprotinina.....	84
4.4 Inibição da atividade amidásica da calicreína tecidual de rato pela aprotinina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.....	85
5 DISCUSSÃO.....	96
5.1 Purificação da calicreína tecidual do rato.....	97
5.2 Critérios de pureza e peso molecular.....	99
5.3 Inibição da atividade amidásica da calicreína tecidual de rato pela aprotinina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.....	100
6 CONCLUSÕES.....	109
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Purificação da calicreína tecidual de rato (rK1) usando-se Bz-Arg-Nan como substrato para a medida da atividade amidásica.....	77
Tabela 2 – Valores dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença de aprotinina segundo os modelos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf.....	94
Tabela 3 – Valores das constantes de inibição, K_i e K_{ii} , para a inibição da rK1 pela aprotinina.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo para a determinação da atividade amidásica da rk1.....	46
Quadro 2 – Protocolo para a determinação de proteínas.....	50
Quadro 3 – Protocolo para a hidrólise total do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan com a β -tripsina.....	66
Quadro 4 – Protocolo para a cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, na ausência e na presença da aprotinina.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema calicreína-cinina e sua interação com a cascata de coagulação e fibrinólise.....	28
Figura 2 – Hidrólise de um peptídeo por uma serino-protease.....	33
Figura 3 – Formação de cininas pela ação enzimática das calicreínas teciduais e plasmáticas sobre os cininogênios.....	36
Figura 4 – Estrutura terciária da aprotinina.....	38
Figura 5 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose.....	78
Figura 6 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.....	79
Figura 7 – Cromatografia de filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.....	80
Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente 5-15% e SDS.....	82
Figura 9 – Espectrometria de massa da rK1.....	83
Figura 10 – Gráfico para a determinação da concentração da rK1 em centro ativo.....	84
Figura 11 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina.....	89

Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina.....	90
Figura 13 – Gráfico de Hanes-Woolf para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina.....	91
Figura 14 – Gráfico de K_m e k_{cat} versus a concentração de aprotinina.....	92
Figura 15 – Gráfico dos parâmetros cinéticos K_m^{ap}/K_m da rK1 em função da concentração de aprotinina.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACTI	Acetilcolina iodada
Ac-Leu-Arg-Nan	N α -acetil-L-leucil-L-arginina-4-nitroanilida
Ac-Phe-Arg-Nan	N α -acetil-L-fenilalanil-L-arginina-4-nitroanilida
BK	Bradicinina
BK1	Receptor de Bradicinina 1
BK2	Receptor de Bradicinina 2
Boc-GGL-p-Na	t-butil-oxi-carbonil-glicina-glicina-leucina-p-nitroanilida
BSA	Albumina de soro bovino
Bz-Arg-Nan	N α -benzoil-L-arginina-4-nitroanilida
Bz-Arg-OEt	N α -benzoil-L-arginina-etil-ester
Bz-Phe-Arg-Nan	N α - benzoil -L-fenilalanil-L-arginina-4-nitroanilida
β -TRB	Beta tripsina bovina
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CPN	Carboxipeptidase N
DABB	4-4´ diazoamina-bis-benzamidina
DABB-PtCl ₂	4-4´ diazoamina-bis-benzamidina complexada ao cloreto de platina
DEAE-sepharose	Dietilaminoetil-sepharose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
D-Val-Leu-Arg-Nan (S ₂₂₆₆)	D-Valina-L-leucina-L-arginina-4-nitroanilida
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
EP	Erro padrão
ϵ	Absortividade molar
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HK/HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
Hz	Hertz
IEI	Complexo inibidor-enzima-inibidor

k_{cat}	Constante catalítica
k_{cat}^{ap}	Constante catalítica aparente
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_m^{ap}	Constante de Michaelis-Menten aparente
KI	Cininase I
KII	Cininase II
K_i	Constante de dissociação do complexo EI
KLK1	Gene da calicreína tecidual humana (hK1)
KLK2	Gene da calicreína glandular humana
KLK3	Gene do antígeno prostático específico/hK3
K_s	Constante de dissociação do complexo ES
LK/LMWK	Cininogênio de baixo peso molecular
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Espectrometria de massa
NEP	Endopeptidase N
NO	Óxido nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PKK	Pré-calicreína
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PSA/hK3	Antígeno prostático específico/Calicreína glandular humana 3
PVC	Poli cloreto de vinila (policloroeteno)
rK1	Calicreína tecidual de rato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Suc-LLVY-AMC	Succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-4-amido-metil-cumarina
TF	Fator tissular
TOF	Time of flight
tPA	Ativador tecidual de plasminogênio
Tris	Tris(hidroximetil)-amino-metano
uPA	Ativador uroquinase de plasminogênio
v/v	Volume por volume
4-NAn	4-nitroanilina

Resumo

As calicreínas são um sub-grupo da família das serino-proteases conhecidas por apresentarem importantes funções fisiológicas dependentes dos tecidos e das circunstâncias de expressão. Elas são encontradas no pâncreas, glândulas salivares, intestinos, rins, glândula pituitária, plasma, soro e outros tecidos. Evidências sugerem que as calicreínas teciduais estão envolvidas em diferentes processos patológicos, incluindo doenças no Sistema Nervoso Central, tais como epilepsia, Alzheimer e câncer, sendo, portanto, futuras candidatas a marcadores tumorais em diferentes órgãos. O objetivo deste trabalho foi a purificação da calicreína tecidual do rato (rK1), isolada da glândula submandibular, a caracterização cinética da sua inibição pela aprotinina e a comparação dos resultados obtidos com dados publicados na literatura. A rK1 foi purificada a partir do pó liofilizado de 300 glândulas submandibulares de ratos Wistar adultos rK1. A purificação constou de: preparação do extrato bruto, seguida de três cromatografias, a saber: cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina e cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC. Proteínas foram dosadas segundo Bradford, 1976 e a atividade amidásica foi determinada com o substrato Bz-Arg-Nan, segundo Erlanger et al., 1961. O fator de purificação foi de 32 vezes e o rendimento foi de 5%. Como critérios de pureza, foram realizadas a eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente 5-15% e SDS 0,1% e a espectrometria de massa. A massa molecular da rK1 foi de 28 kDa. A titulação da solução da rK1 purificada com a aprotinina revelou uma concentração de 692 nM, em centro ativo. A

hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, em pH 9,0, 37°C, foi estudada na ausência e na presença de concentrações crescentes de aprotinina. Os resultados mostraram que a hidrólise seguiu à cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentrações do substrato utilizadas (120 a 640 μM). Os valores calculados de K_m e k_{cat} foram $104,2 \pm 24,6 \mu\text{M}$ e $8641 \pm 572 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. A inibição da rK1 pela aprotinina é competitiva parabólica, um tipo raro de inibição, onde duas moléculas de aprotinina se ligam a uma molécula da enzima. Os valores calculados de K_i e K_{ii} foram $26,4 \pm 12 \text{ nM}$ e $16,9 \pm 8,8 \text{ nM}$, respectivamente.

A inibição da hK1 pela aprotinina, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, é competitiva parabólica e, portanto, semelhante à inibição da calicreína tecidual humana (hK1) com o mesmo substrato.

Palavras-chave: Inibição da calicreína tecidual do rato, inibição competitiva parabólica, calicreína, aprotinina.

Abstract

Kallikreins are a group of serine proteases that play an important role in many physiologic processes depending on the tissue end conditions of expression. They are found in pancreas, salivary glands, intestine, kidneys, pituitary gland, plasma and other tissues. Many kallikreins seem to be related in many pathologic processes, including in central nervous system (CNR), such as epilepsy and Alzheimer, and cancer, being, therefore, future biomarkers for tumours of different organs. The aim of this study was to establish the kinetic model of the inhibition of rat tissue kallikrein, isolated from submandibular glands, by aprotinin and to compare the results with data from literature. Lyophilized powder was obtained from three hundred submandibular glands extracts of adults Wistar rats and rK1 was purified by DEAE-Sepharose, Sepharose-aprotinin and gel filtration Superose 12 HR column chromatographies. The protein concentration was determined by Bradford method (1976) and the rK1 amidasic activity was determined with Bz-Arg-Nan as substrate. The purification factor was 32 with 5% recovery. Electrophoresis was performed using 5-15% gradient polyacrilamide gel and 0,1% SDS. Mass spectrometry was also accomplished. Both methods showed a pure rK1 corresponding to M_r 28000 approximately. Purified rK1 was titrated with aprotinin and its active center concentrations, was 692 nM. Hydrolysis of D-Val-Leu-Arg-Nan by rK1, at pH 9.0 and 37°C, was carried out in the absence and in the presence of increasing concentrations of aprotinin. The results showed that the hydrolyses followed Michaelis-Menten kinetics on the wide range of substrate concentration (120-640 μ M). K_m and k_{cat} values are 104.2 ± 24.6 and 8641 ± 572

min^{-1} , respectively. The data indicated that inhibition of rK1 by aprotinin is not a simple competitive inhibition, but that it is a competitive inhibition of the parabolic type. Parabolic competitive inhibition is a rare type of enzyme inhibition, in which two aprotinin molecules bind to one rK1 molecule. The calculated values of the constants K_i and K_{ij} were, 26.4 ± 12.0 and 16.9 ± 8.8 nM, respectively. Parabolic competitive inhibition was also reported for the hK1 inhibition by aprotinin with D-Val-Leu-Arg-Nan as substrate.

Key words: Rat tissue kallikrein inhibition, parabolic competitive inhibition, kallikrein inhibition, kallikrein, aprotinin.

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

1.1 Serino-proteases

Enzimas proteolíticas podem ser classificadas baseando-se no seu mecanismo catalítico. Classes de enzimas proteolíticas incluem proteases com um resíduo ativado de cisteína (cisteíno-proteases), de aspartato (aspartato-proteases), de serina ativa (serino-proteases) ou de um íon metálico (metalo-proteases) nos seus centros ativos. Serino-proteases são uma família de enzimas que utilizam um único resíduo ativado de serina para hidrolizar cataliticamente as ligações peptídicas nos seus substratos.

Essa grande família inclui enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina), alguns fatores da coagulação e as calicreínas (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

Serino-proteases estão envolvidas em muitas funções fisiológicas como a digestão, coagulação sanguínea e fibrinólise, remodelamento tecidual e ativação de hormônios e fatores de crescimento e degradação da matriz extracelular (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

O sítio ativo de uma enzima realiza a dupla função de ser a região de catálise da reação bem como de se ligar ao substrato. É a eficiência desse comportamento que determina a atividade total de uma enzima frente a um substrato, isto é, determina a especificidade da enzima. É possível obter informações do sítio ativo de uma enzima pelo estudo cinético de reações enzimáticas com diferentes substratos (SCHECHTER & BERGER, 1967).

A atividade protéica catalisada por serino-proteases é um exemplo de proteólise limitada, isto é, a hidrólise da proteína está limitada a uma ou duas ligações peptídicas particulares entre centenas de ligações peptídicas de um

substrato protéico. As serino-proteases exibem preferências para a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma particular classe de aminoácidos. Entretanto, a atividade de uma protease específica para um certo tipo de aminoácido somente indica a sua preferência. Ela pode ser capaz de clivar outros substratos, embora em uma velocidade mais lenta. (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

1.2 Sistema calicreína-cinina

O sistema calicreína-cinina é constituído por: calicreínas, enzimas proteolíticas presentes em vários tecidos; cininogênios, proteínas do grupo das α_2 -globulinas, produzidos no fígado, que são substratos das calicreínas; cininas, peptídeos vasoativos e espasmogênicos resultantes da proteólise limitada dos cininogênios pelas calicreínas; e cininases, enzimas proteolíticas que inativam as cininas.

1.3 Calicreínas

As calicreínas (EC 3.4.21.8) são um sub-grupo da família das serino-proteases conhecidas por apresentarem importantes funções fisiológicas (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003). Elas liberam peptídeos vasoativos, as cininas de seus substratos, os cininogênios, que estão presentes no plasma, linfa e líquidos

intersticiais sendo, portanto, denominadas, cininogenases. Estas enzimas atuam de forma acentuada e *in vivo* sobre vasos sanguíneos e músculo liso e, de forma indireta, pela liberação de peptídeos farmacologicamente ativos, as cininas (SCHACHTER, 1980).

Segundo Hecquet et al., 2000, as calicreínas e algumas outras serino-proteases ativam diretamente o receptor B2 da bradicinina em humanos, independente da liberação da bradicinina.

A descoberta da calicreína iniciou-se na década de 20 quando E. K. Frey (1926) observou que a injeção intravenosa da urina de um cão em outro cão causava-lhe uma prolongada hipotensão arterial. Frey e Kraut observaram que a substância presente na urina do cão era não dialisável e termolábil. Frey e seus colaboradores consideraram a substância ativa como um hormônio e denominaram-na *Kreislaufhormon* (SCHACHTER, 1980).

Posteriormente, Frey, Kraut e Schultz (1930) verificaram que o conteúdo de um cisto removido de um pâncreas humano, quando injetado intravenosamente em um cão, causou-lhe uma brusca diminuição na pressão sanguínea. Pela constatação de que o pâncreas constituía uma fonte rica dessa substância, ela foi denominada *Kallikréas* que em grego significa pâncreas.

Com a continuidade de seus experimentos, Frey et. al. (1930) demonstraram que a extirpação do pâncreas causava uma acentuada diminuição da excreção da calicreína na urina e, logicamente, consideraram a calicreína como um hormônio pancreático. Continuando estes estudos, Werle (1934) demonstrou que a extirpação do pâncreas em cães, ao contrário de humanos, não apresentou

diminuição da excreção urinária da calicreína. A partir dessa observação, constatou-se que a calicreína era produzida em outros órgãos, além do pâncreas.

Durante a pesquisa por outros órgãos que também produziam calicreína, as glândulas salivares também foram avaliadas por já ser conhecida a capacidade da saliva de diminuir a pressão sanguínea quando injetada em cães. Em menos de 10 anos, foram caracterizadas calicreínas no pâncreas, urina, plasma, glândulas salivares, intestino, pulmões, cérebro e nervos.

Em 1937, Werle e colaboradores demonstraram que uma substância de baixo peso molecular e termoestável, liberada enzimaticamente pela calicreína de um precursor inativo no plasma humano, apresentava ação contrátil sobre o íleo isolado de cobaia. Essa substância foi denominada DK (*darmkontrahierende substanz*) e, em 1948, foi chamada, por Werle e Berek, de calidina e seu precursor, o substrato para a calicreína, foi denominado calidinogênio (SCHACHTER, 1980).

Em 1949, Rocha e Silva e colaboradores demonstraram que a incubação do veneno de *Bothrops jararaca* e/ou tripsina com a fração globulínica do plasma resultava na formação de uma substância que produzia uma lenta e duradoura contração do íleo isolado de cobaia. A contração era considerada lenta quando comparada com a contração provocada pela histamina ou acetilcolina. Em virtude dessa resposta lenta, a substância foi denominada bradicinina, pois *bradys* e *kinein* representam, em grego, lento e movimento, respectivamente (SCHACHTER, 1980). Rocha e Silva e colaboradores observaram, ainda, que a ação da bradicinina não era antagonizada pela atropina ou pelos anti-histamínicos.

Em 1954, Schachter e Thain introduziram o termo *cinina* para o grupo de peptídeos, ao qual pertencia a calidina e a bradicina, intimamente relacionados e que eram liberados de um substrato no plasma por calicreínas, tripsina, veneno de *Bothrops jararaca* e, possivelmente, por outras proteases.

Em 1960, Schachter et. al. introduziram o termo genérico *cininogenase* para todas as enzimas que liberam cininas e *cininogênio* para o substrato dessas enzimas (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

As calicreínas são encontradas em células glandulares, neutrófilos e líquidos biológicos e são divididas em dois principais sub-grupos: calicreínas teciduais e calicreínas plasmáticas. Os dois grupos de calicreínas distinguem-se em seus pesos moleculares, pontos isoelétricos, especificidades para substratos, características imunológicas e tipos de cininas liberadas (BHOOLA et. al., 1992).

A calicreína plasmática (EC 3.4.21.34) participa da ativação dependente de superfície da coagulação sanguínea, da fibrinólise, da regulação do tônus vascular e da inflamação. Eventos moleculares iniciais da cascata da coagulação envolvem a ativação de proenzimas, denominadas fator XII (Fator de Hageman), fator XI e pré-calicreína, sendo o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) essencial para a ativação.

A calicreína plasmática é codificada por um único gene, sintetizada no fígado e secretada pelos hepatócitos na forma inativa (pré-calicreína). Ela circula no plasma como um complexo, ligada ao HMWK, através de uma ligação não covalente, e aos fatores XI e XII da cascata da coagulação. A pré-calicreína é uma glicoproteína com pI 8,9 com peso molecular de 88000. Assim, seguindo-se a uma

lesão vascular, o HMWK estaciona-se sobre as superfícies endotelial e tecidual nas quais ele permanece fixado por ligações eletrostáticas. A seguir, o Fator XII é ativado (Fator XIIa) e ativa tanto a pré-caliceína em caliceína quanto o Fator XI em Fator XI ativo (Fator XIa). O Fator XIa ativa o Fator X, que por sua vez, continua o processo da coagulação. A caliceína, por sua vez, em um processo de auto-ativação, ativa mais pré-caliceína. Há conversão do plasminogênio em plasmina promovendo a fibrinólise. A caliceína plasmática, além de ativar a própria pré-caliceína e o Fator XII, atua sobre o HMWK liberando a bradicinina (BHOOLA et al., 1992). Há, também, trabalhos na literatura indicando que a caliceína plasmática pode ativar a pró-uroquinase circulante. Estas informações mostram, claramente, que a caliceína plasmática faz parte do importante processo de coagulação, como mostrado na Figura 1.

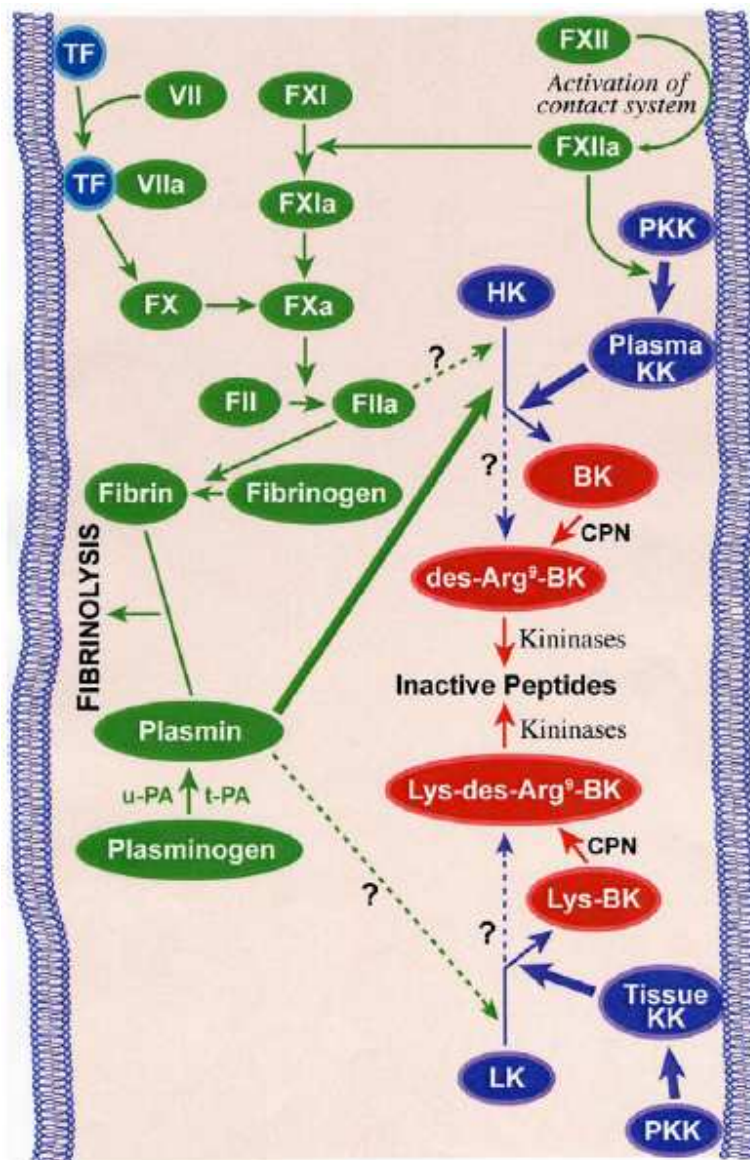


FIGURA 1 – Sistema caliceína-cinina e sua interação com a cascata de coagulação e fibrinólise. TF: Fator tissular; PKK: pré-caliceína; HK: cininogênio de alto peso molecular; LK: cininogênio de baixo peso molecular; BK: bradicinina; CPN: carboxipeptidase N; t-PA: ativador de plasminogênio tecidual; u-PA: ativador de plasminogênio uroquinase. (Extraído de MOREAU et al., 2005).

A calicreína plasmática exerce efeito importante sobre os leucócitos polimorfonucleares, que pode ser de grande relevância no processo inflamatório. (BHOOLA et al., 1992).

A calicreína plasmática é rapidamente inativada pelo inibidor C1, que tem a capacidade de, sozinho, inibir com alta afinidade a calicreína plasmática e o Fator XIIa. Além disso, a inibição da calicreína plasmática poderia ocorrer com a α 2-macroglobulina, com a antitrombina III e com mutantes da α 1-antitripsina (BHOOLA et al., 1992).

As calicreínas teciduais (EC 3.4.21.35) pertencem a uma grande família multigênica, que demonstra semelhanças nos níveis genético, protéico e estrutural (YOUSEF & DIAMANDIS, 2001). Inicialmente, pensava-se que a família genética das calicreínas era composta, apenas, de três membros: o gene KLK1 que codifica a calicreína tecidual pancreática e renal (hK1); o gene KLK2 que codifica a calicreína glandular humana (hK2) e o gene KLK3 que codifica o antígeno prostático específico ou PSA (hK3). Novos genes para as calicreínas e para enzimas semelhantes às calicreínas foram descobertos (YOUSEF et al., 2000). Portanto, a família gênica das calicreínas teciduais foi totalmente caracterizada e inclui 15 membros, localizados seqüencialmente no cromossomo 19q13.4 (YOUSEF & DIAMANDIS, 2001). Das proteínas expressas pelos genes da família das calicreínas teciduais humanas, apenas a hK1 é realmente uma calicreína, isto é, é a única enzima capaz de liberar a calidina do cininogênio de baixo peso molecular. As calicreínas teciduais são encontradas no pâncreas, glândulas salivares, intestinos, rins, plasma e soro. Aproximadamente 9% do total de

proteínas das glândulas submandibulares é constituído de calicreínas (ORSTAVIK et al., 1982).

Evidências sugerem que as calicreínas têm diversas outras funções, dependendo do tecido e das circunstâncias de expressão (BHOOLA et al., 1992). Além da sua atividade cininogénica, a calicreína tecidual parece estar envolvida com fatores de crescimento e hormônios peptídicos (MASON et al., 1983), baseando-se na sua presença na glândula pituitária, pâncreas e outros tecidos. Segundo Bhoola et al., (1992), a calicreína tecidual pode clivar também a pró-insulina, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), o precursor do fator natriurético atrial, a prorenina, o peptídeo vasoativo intestinal, a procologenase e o angiotensinogênio.

No rato, a família gênica das calicreínas teciduais compreende até 20 genes intimamente relacionados que mostram diversos e variados modelos de expressão (BHOOLA et al., 1992). Em 2003, Yousef e Diamandis publicaram um artigo em que afirmam que, no rato, a família das calicreínas teciduais tem 13 membros dos quais, pelo menos 10, são transcricionalmente ativos e, portanto, codificam serino-proteases potencialmente ativas que têm 261 resíduos de aminoácidos. Admite-se que os três genes restantes sejam pseudo-genes. As calicreínas teciduais do rato estão agrupadas na mesma região cromossomal e mostram um alto grau de homologia estrutural. Como no homem e no camundongo, no rato somente um gene, rKLK1, codifica uma proteína que satisfaz a definição funcional de uma calicreína, a saber: libera uma cinina - a bradicinina - dos cininogênios. O gene rKLK2 codifica a tonina, uma enzima que converte o

angiotensinogênio em angiotensina II. O gene rKLK10 codifica uma cininogenase que hidrolisa o T-cininogênio liberando a T-cinina (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003)

Segundo Yousef e Diamandis (2003), recentemente foi introduzido o conceito de família multigênica para as calicreínas. O termo genérico “calicreína tecidual” não está restrito à descrição de enzimas que liberam peptídeos bioativos de moléculas precursoras. Ao contrário, designa um grupo de enzimas com estrutura protéica altamente conservada que, também, compartilham considerável homologia na sequência de aminoácidos e se localizam no mesmo local cromossomal. Assim, o termo calicreína não implica, necessariamente, que, quaisquer dos membros dessa família (com exceção da hK1 e rK1), tenham atividade cininogenásica. De fato, para os membros da família das calicreínas teciduais humanas, que foram funcionalmente testadas, encontrou-se que eles possuem muito baixa (hK2) ou nenhuma (hK3 ou PSA) atividade cininogenásica. Esses genes são agrupados juntamente com o KLK1 baseando-se nas semelhanças estruturais e no mapa de localização genética (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

O sequenciamento do RNA mensageiro que codifica a calicreína submandibular de rato revelou que a enzima conserva os aminoácidos Histidina, Aspartato e Serina da tríade catalítica das serino-proteases, nas posições His-41, Asp-96 e Ser-189 (ASHLEY & MACDONALD, 1985)

O centro ativo das calicreínas teciduais, proposto por Mares-Guia e Diniz (1967), é constituído dos seguintes sítios: sítio aniônico – responsável pela ligação do substrato por meio de atração eletrostática do seu nitrogênio carregado positivamente; sítio hidrofóbico – responsável pela ligação da cadeia lateral

hidrocarbonada de resíduos lisil ou arginil; sítio catalítico – responsável pela hidrólise do substrato; sítio auxiliar – evidenciado pela ativação da hidrólise do TAME pelo próprio TAME.

No sítio catalítico das calicreínas teciduais, constituído da tríade catalítica His-Asp-Ser, a hidrólise de ligações peptídicas inicia-se com o ataque do oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina ao carbono carbonílico susceptível da ligação peptídica formando um intermediário tetraédrico. No mesmo momento, a serina transfere um próton para o resíduo de histidina da tríade catalítica, depois para o átomo de nitrogênio susceptível da ligação peptídica, que é quebrada. A parte do substrato é agora covalentemente ligada à serina por uma ligação éster, formando a acil enzima. A carga positiva que se desenvolve na histidina neste estágio é parcialmente neutralizada pelo terceiro resíduo da tríade catalítica, o aspartato. Este processo é seguido pela desacilação, onde a histidina extrai um próton da molécula de água e o íon hidroxila ataca o carbono carbonílico do grupo acila que está ligado à serina formando, novamente, um intermediário tetraédrico. Em seguida, a histidina doa um próton para o átomo de oxigênio da serina, liberando o componente ácido do substrato e regenerando a enzima (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003). Essas etapas estão ilustradas na figura 2.

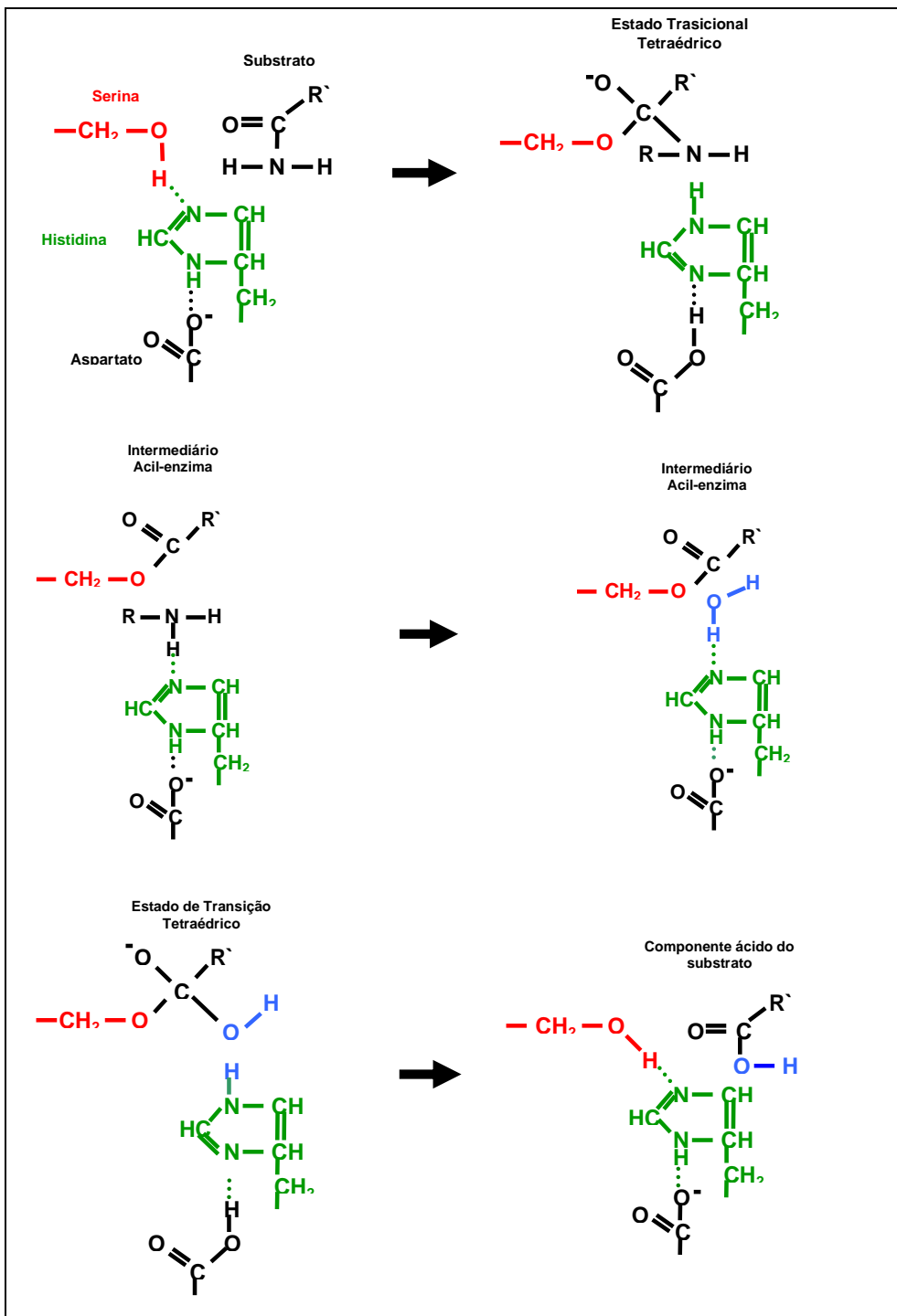


Figura 2 – Hidrólise de um peptídeo por uma serino-protease. Etapas de acilação e dasacilação. A desacilação é essencialmente o reverso da acilação, com a molécula de água substituindo o componente amino do substrato (Adaptado de STRYER, 1981).

1.4 Cininogênios

Os precursores das cininas, os cininogênios, são glicoproteínas de cadeia única, originados de um mesmo gene localizado no cromossomo 3q26 e estão presentes no plasma e líquidos biológicos.

Nos mamíferos, três diferentes tipos de cininogênios já foram caracterizados e descritos, diferindo no tamanho, estrutura e funções biológicas: o cininogênio de alto peso molecular (HMWK), uma α -globulina, com peso molecular de 88000 a 120000 e o cininogênio de baixo peso molecular (LMWK), uma β -globulina com peso molecular de 50000 a 68000. Um terceiro tipo de cininogênio, comumente designado como T-cininogênio, com peso molecular de aproximadamente 68000, é específico do rato, é susceptível à tripsina e não é susceptível à clivagem proteolítica por calicreínas plasmáticas e teciduais (MÚLLER-ESTERL et al., 1988).

Ambos os cininogênios, de alto e de baixo pesos moleculares, possuem seqüências de aminoácidos idênticas na porção N-terminal (cadeia pesada) e na seqüência da bradicinina, que liga à porção C-terminal (cadeia leve), a qual difere-se em ambos os cininogênios. Em associação ao Fator Hageman, Fator XI e a pré-calicreína plasmática, o cininogênio de alto peso molecular se liga às superfícies carregadas negativamente (endotélio danificado) através da histidina localizada na cadeia leve da sua molécula, iniciando a cascata da coagulação. A função da cadeia leve no cininogênio de baixo peso molecular ainda é desconhecida (MOREAU et al., 2005). Ambos os cininogênios são constituídos de uma cadeia pesada, seguida da seqüência da cinina e, posteriormente, uma

cadeia leve. As cadeias pesadas dos dois cininogênios são semelhantes, com pesos moleculares de 64000 e 63000 para o cininogênio de alto peso molecular e para o cininogênio de baixo peso molecular, respectivamente. Entretanto, as cadeias leves dos cininogênios diferem-se consideravelmente no tamanho, enquanto a cadeia leve do LMWKr tem o peso molecular aparente de 5000, a cadeia leve do HMWK tem um peso molecular aparente de 58000. As diferenças funcionais de ambos os cininogênios humanos é refletida pela diferença estrutural de suas respectivas cadeias leves (MÜLLER-ESTERL et al., 1985).

A principal função biológica da calicreína tecidual humana (hK1) é a hidrólise altamente seletiva da proteína plasmática cininogênio de baixo peso molecular, em duas diferentes ligações peptídicas, Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰, e Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰, para liberar, estequiometricamente, o decapeptídeo vasoativo e espasmogênico calidina (lisil-bradicinina). A proteólise limitada do cininogênio de alto peso molecular pela calicreína plasmática resulta em uma rápida liberação do nonapeptídeo bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Já a calicreína tecidual do rato (rK1) libera a bradicinina dos dois cininogênios. A Figura 3 mostra, esquematicamente, a liberação de cininas dos cininogênios pelas calicreínas plasmática e tecidual.

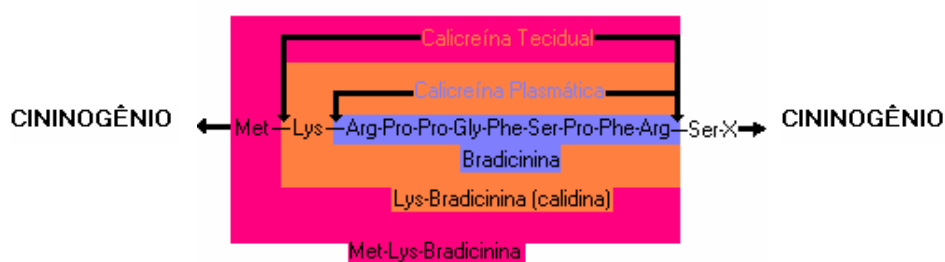


FIGURA 3 – Formação de cininas pela ação enzimática das caliceínas teciduais e plasmáticas sobre os cininogênios (Adaptado de BHOOLA, 1992).

1.5 Cininas

As cininas são potentes peptídeos vasoativos e espasmogênicos liberados pelas caliceínas e influenciam vários processos fisiológicos e patológicos. Elas ativam células endoteliais, levando à vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular e estão envolvidas na ativação do ativador tecidual de plasminogênio (t-PA), liberação de óxido nítrico (NO) e mobilização do ácido araquidônico. Assim, participam da regulação da pressão sanguínea, das funções renais e cardíaca e de processos patológicos, como o processo inflamatório (MOREAU et al., 2005)

Até agora, dois tipos de receptores de cininas foram caracterizados, BK1 e BK2. Os receptores BK1 parecem estar ausentes normalmente, mas a sua expressão em células de músculo liso e fibroblastos torna-se evidente em estados patológicos, particularmente na inflamação (BHOOLA et al., 1992).

1.6 Cininases

Cininases são peptidases responsáveis pela inativação enzimática das cininas. A família das cininases é constituída pela cininase I (KI) e pela cininase II (KII). A KI é classificada em dois grupos: KI-carboxipeptidase-N (KI-CPN), descoberta originalmente no plasma humano e, KI-carboxipeptidase-M (KI-CPM) encontrada em fibroblastos, células endoteliais da artéria pulmonar e placenta. A KII é classificada em KII-enzima conversora de angiotensina (KII-ACE) e KII-endopeptidase neutra (KII-NEP). A KII-ACE inativa a bradicina circulante principalmente durante a sua passagem pelo pulmão, enquanto que a KII-NEP está associada à migração de neutrófilos para sítios inflamatórios (BHOOLA et al., 1992).

1.7 Aprotinina

A aprotinina é um inibidor de serino-proteases que foi descoberto em 1930 por Frey et al. na Universidade de Munique. O grupo isolou um inibidor de calicreína de tecidos pulmonares e pancreáticos bovinos. Em 1936, Kunitz e Northrup isolaram, também de tecidos pancreáticos, um inibidor de tripsina. Em 1959, o inibidor bovino de tripsina foi denominado aprotinina e utilizado no tratamento de pancreatite. No final da década de sessenta, foi caracterizado que o inibidor de calicreína e o inibidor de tripsina eram a mesma substância, conhecidas também, como aprotinina ou inibidor básico pancreático de tripsina

(BPTI). A aprotinina é um pequeno polipeptídeo, constituído de 58 aminoácidos, com peso molecular de 6512. Ela possui um resíduo lisil na posição 15 da molécula, que participa da ligação enzima-inibidor e determina a sua especificidade (BECKMANN et al., 1988). A Figura 4 mostra a estrutura terciária da aprotinina.

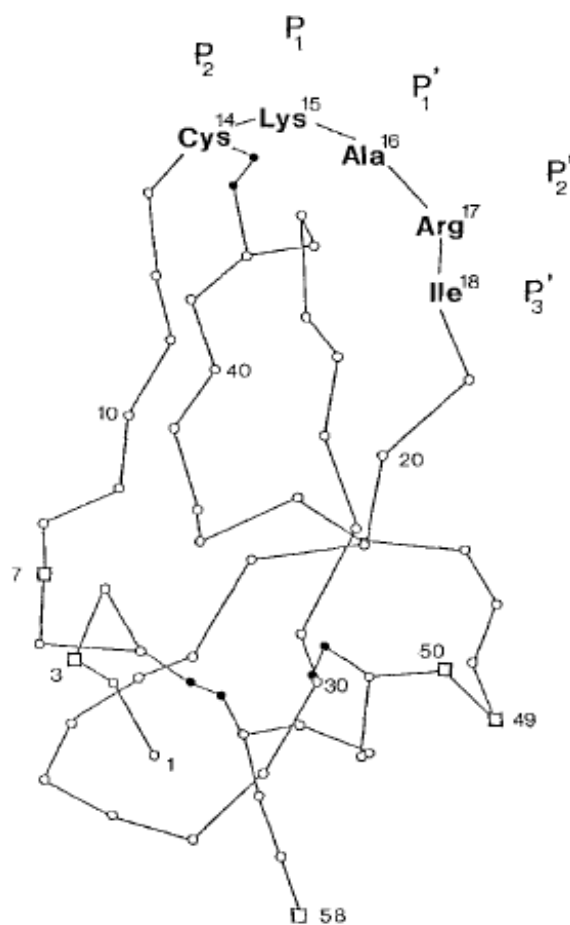


FIGURA 4 – Estrutura terciária da aprotinina. Os resíduos de aminoácidos localizados no seu sítio de reação estão indicados. (Extraído de BECKMANN et al., 1988.)

A relevância fisiológica de cada componente do sistema calicreína-cinina aumenta na medida em que ocorrem os importantes avanços sobre a genealogia, caracterização genética das calicreínas, dos cininogênios e das cininases e sobre a biologia molecular dos receptores de cininas e dos sinais transmissores modulados por cininas, etc. A descoberta recente da presença no neutrófilo da calicreína tecidual e da expressão dos cininogênios de alto e baixo pesos moleculares, além da pré-calicreína plasmática, assegura um importante papel das cininas em doenças inflamatórias como artrite, asma, rinite alérgica e choque séptico.

Uma outra grande área a ser pesquisada é a relação entre as calicreínas e o câncer. A expressão de genes da calicreína tecidual e a subsequente formação de cininas pode estimular a proliferação de células tumorais devido à habilidade das cininas em promover a vasodilatação e aumentar a permeabilidade e, assim, aumentar o fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento ao tumor (WOLF et al., 2001).

Muitas calicreínas têm mostrado algum nível de expressão em tumores na próstata, mamas, testículo e ovário. O estudo de interações entre as calicreínas é uma área a ser explorada com o intuito de se elucidar os seus mecanismos biológicos, considerando o fato de que muitas calicreínas são co-expressas em um mesmo tecido e ainda, são capazes de ativar umas às outras e possuem o mesmo padrão de sub-regulação hormonal por esteróides. Talvez isso poderia explicar o porquê de alguns hormônios afetarem a iniciação ou progressão de algumas malignidades (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

Em 2001, Wolf et al. demonstraram que o uso de um inibidor sintético específico de calicreínas teciduais (FE999024) diminui significativamente a invasividade de células tumorais mamárias em testes, *in vitro*, de forma dose-dependente, em um máximo de 39%. Este fato decorre da capacidade das calicreínas teciduais de, *in vitro*, ativarem 2 metaloproteínas (progelatinases A e B) responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Portanto, o uso de inibidores de calicreínas teciduais pode ter um grande valor terapêutico no tratamento de doenças metastáticas.

É possível que algumas calicreínas possam se tornar alvos terapêuticos valiosos a partir do momento em que os seus mecanismos biológicos estejam completamente elucidados. Uma vez conhecidos, esses eventos podem ser manipulados através de indução ou ativação enzimática. Ainda, considerando o nível protéico dessas enzimas, há alguns trabalhos afirmando que as calicreínas teciduais podem ser usadas como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do câncer (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a cinética da inibição da calicreína tecidual do rato (rK1), isolada da glândula submandibular, utilizando a aprotinina como inibidor, visando esclarecer melhor as propriedades catalíticas da enzima.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Purificar a calicreína tecidual do rato a partir do pó liofilizado de glândulas submandibulares através de cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose, cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina e cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12HR 10/30 em equipamento FPLC.

2.2.2 Realizar estudos cinéticos da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, a fim de se verificar se a cinética segue ou não o modelo proposto por Michaelis-Menten.

2.2.3 Determinar os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1.

2.2.4 Estudar a inibição pela aprotinina da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1.

2.2.5 Determinar a constante de inibição K_i da rK1 pela aprotinina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água destilada e deionizada em equipamento Milli Q, gentilmente fornecida pelo Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

3.1 Amostra

A amostra utilizada foi o pó liofilizado resultante de 300 glândulas submandibulares extraídas de ratos Wistar adultos (75 a 115 g) criados no Biotério do Instituto de Ciência Biológicas – UFMG. Os ratos foram anestesiados com 0,1 mL de tiopental (1 g/100 mL), para cada 100 g de peso do rato e retiradas as glândulas submandibulares, os rins e os corações. Os órgãos foram colocados em béqueres separados contendo salina e mantidos em banho de gelo. A seguir, eles foram comprimidos entre papel absorvente para eliminação do sangue e da salina residuais e armazenados a - 20°C. Posteriormente, as glândulas foram descongeladas e trituradas em multiprocessador Arno. A massa resultante foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. O pó resultante foi estocado em geladeira até o início da execução deste trabalho.

3.2 Metodologia Laboratorial

3.2.1 Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato (rK1)

A atividade amidásica da rK1 era determinada utilizando-se o substrato N α -benzoil L-arginina 4-nitroanilida (Bz-Arg-Nan), como descrito por Sousa (1993). A solução estoque do Bz-Arg-Nan era preparada reconstituindo-se 196 mg do substrato em 5,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração teórica desta solução era 90,16 mM. Esta solução era distribuída em alíquotas de 500 μ L e armazenadas a - 20 °C. Para ser utilizada na incubação, a solução estoque era diluída a 1:100 em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v). A concentração teórica dessa solução era 901,6 μ M.

A reação enzimática era realizada em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v) durante 30 min a 37°C. Para tanto, adicionava-se a solução do substrato à amostra e à amostra + Trasylol[®] (solução de aprotinina) 1000 Unidades Inibidoras de Calicreína/mL, todos equilibrados a 37°C. Controles da amostra sem o substrato e do substrato sem a amostra eram incubados nas mesmas condições. Após 30 min de incubação, a reação era paralisada pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

As incubações eram realizadas em triplicatas. A amostra e os reagentes

eram adicionados conforme o quadro 1 mostrado a seguir:

QUADRO 1 – Protocolo para a determinação da atividade amidásica da rk1

ETAPAS DE ADIÇÃO	AMOSTRA (μL)	AMOSTRA + TRASYLOL (μL)	CONTROLE DA AMOSTRA (μL)	CONTROLE DO SUBSTRATO (μL)
TAMPÃO GLICINA	200	-	1000	400
AMOSTRA	200	200	200	-
TRASYLOL	-	200	-	-
Banho-maria 10 minutos a 37°C				
SUBSTRATO	800	800	-	800
Banho-maria 30 minutos a 37°C				
ÁCIDO ACÉTICO	200	200	200	200

Para zerar o espectrofotômetro era utilizado o tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v), que era mantido na célula de referência.

A reação enzimática era monitorada pela leitura das absorvâncias em 410 nm da 4-nitroanilina (4-NAn) liberada ($\epsilon_{410} = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER et al., 1961). O valor da absorvância era convertido em velocidade expressa em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, utilizando-se a seguinte equação:

$$v = \frac{\Delta A_{410} \times 1,17 \times 5}{8.800 \times 30} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

v = velocidade da reação em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

ΔA_{410} = leitura da absorvância em 410 nm da mistura de incubação, contendo o substrato e a amostra, menos a soma das leituras das misturas de incubação do controle do substrato, do controle da amostra e da amostra + Trasyol®.

1,17 = fator de correção para o volume (volume da mistura, cuja absorvância foi lida, dividido pelo volume da mistura de incubação, ou seja, $1400 \mu\text{L} / 1200 \mu\text{L}$).

$8.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ = absortividade molar da 4-NAn

30 = tempo de incubação em min

5 = fator de conversão de $200 \mu\text{L}$ da amostra para 1 mL.

A atividade amidásica específica da rK1 era a velocidade (v) dividida pela concentração de proteínas (mg/mL) em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

3.2.2 Preparação do padrão de albumina de soro bovino (BSA) a 0,5 mg/mL

A solução padrão, estoque, de albumina de soro bovino (BSA) era preparada na concentração de 0,5 mg/mL em água Mili-Q contendo solução de azida sódica a 0,01% (p/v). A absorvância da solução padrão de albumina foi lida a 280 nm para a determinação da sua concentração real. Esta foi calculada utilizando-se a equação:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \text{Eq. 2}$$

onde:

a = absortividade = $0,7693 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL}$

b = 1 cm

c = concentração real da solução de BSA em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

A solução foi distribuída em alíquotas de 1 mL em microtubos tipo Eppendorf e armazenados a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas nas amostras era realizada pelos métodos de Bradford (1976) segundo Peterson (1983), utilizando-se a albumina de soro bovino como padrão, como descrito por Sousa (1993). O princípio deste método de Bradford baseia-se na ligação da proteína ao corante

Azul Brilhante de Coomassie. A ligação da proteína ao corante altera a absorvância máxima do corante de 465 nm para 595 nm, sendo a absorvância da amostra monitorada em 595 nm.

O reagente de cor era preparado dissolvendo-se 25 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250 em 12,5 mL de etanol a 95% (v/v), adicionando-se a esta solução 25 mL de ácido fosfórico a 85% (v/v). A solução resultante era diluída para um volume final de 250 mL com água Mili-Q. A solução era armazenada entre 2 e 8°C e filtrada em papel de filtro qualitativo no momento de uso.

Como padrão protéico era utilizada a solução estoque de albumina de soro bovino (BSA) já descrita. A partir desta solução, eram preparados três padrões de concentrações 0,005 mg/mL, 0,010 mg/mL e 0,025 mg/mL, em um volume final de 0,5 mL do mesmo tampão em que a amostra estava dissolvida.

As incubações eram realizadas em triplicatas e à temperatura ambiente durante 10 min, conforme o quadro 2 a seguir.

Quadro 2 – Protocolo para a determinação de proteínas

ETAPAS DE ADIÇÃO	B	P ₁	P ₂	P ₃	A
TAMPÃO (mL)	0,5	-	-	-	-
PADRÃO 1 (mL)	-	0,5	-	-	-
PADRÃO 2 (mL)	-	-	0,5	-	-
PADRÃO 3 (mL)	-	-	-	0,5	-
AMOSTRA (mL)	-	-	-	-	0,5
REAGENTE DE COR (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Onde: B = branco; P₁ = padrão 1 a 0,005 mg/mL; P₂ = padrão 2 a 0,010 mg/mL; P₃ = padrão 3 a 0,025 mg/mL ; A = amostra.

O espectrofotômetro era zerado com o branco, conforme descrito no quadro acima, para as leituras de absorvância dos padrões e da amostra. O branco era mantido na célula de referência.

A concentração de proteínas da amostra em mg/mL era calculada a partir das absorvâncias obtidas, conforme equação 1.0 descrita por Peterson (1983) (Eq. 3).

$$P = b \cdot A [1 - (A \cdot a)]^{-1} \quad \text{Eq. 3}$$

sendo

$$a = A^{-1} - b \cdot P^{-1}$$

$$b = (A_1^{-1} - A_2^{-1}) / (P_1^{-1} - P_2^{-1})$$

$$A^{-1} = (A_1^{-1} + A_2^{-1}) / 2$$

$$P^{-1} = (P_1^{-1} + P_2^{-1}) / 2$$

onde:

P = concentração da amostra em proteína (mg/mL)

A = absorvância da amostra em 595 nm

A₁ = absorvância do padrão de menor concentração

A₂ = absorvância do padrão de maior concentração

P₁ = concentração do padrão de menor concentração (mg/mL)

P₂ = concentração do padrão de maior concentração (mg/mL)

Para os cálculos, foram selecionados dois dos padrões, cujos valores de absorvância eram mais próximos, sendo um menor e outro maior do que os valores de absorvância da amostra.

3.3 Purificação da calicreína tecidual de rato

3.3.1 Preparação da amostra

O pó de glândulas submandibulares de rato foi primeiramente desengordurado. Para tanto, utilizaram-se 300 mL de éter etílico para uma massa de aproximadamente 4,5 g do pó. A mistura foi macerada em gral de porcelana e, em seguida, transferida para um béquer tampado com filme de PVC e agitada em agitador magnético durante 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada com auxílio de bomba a vácuo e a massa foi secada em placas de Petri, tampadas com filme de PVC, perfuradas com agulha e deixadas na capela durante 18 horas à temperatura ambiente para evaporação completa do éter. Repetiu-se este procedimento uma segunda vez para assegurar que o desengorduramento fosse mais completo. O pó seco foi pesado em balança analítica (4,38 g) e armazenado em recipiente hermeticamente fechado entre 2 e 8°C até o momento de uso.

3.3.2 Preparação do extrato bruto

Para a preparação do extrato bruto, pesaram-se, inicialmente, 2,0 g do pó desengordurado e adicionaram-se 40 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol e azida de sódio 0,01% (p/v). A mistura foi agitada durante aproximadamente 5 horas a 4°C em béquer com barra magnética e centrifugada a 9000 rpm (9,37 x g) durante 30 min, em centrífuga refrigerada a 4°C. Repetiu-se esse procedimento três vezes para garantir uma melhor extração. Após cada centrifugação, o sobrenadante era recolhido e denominado extrato bruto. Foram obtidas, portanto, 4 amostras de extrato bruto. Dosou-se a atividade amidásica da rK1 nas 4 amostras. Reuniram-se as 4 amostras formando-se um primeiro volume do extrato bruto (extrato bruto 1) de 160 mL.

Posteriormente, pesaram-se 2,31 g do pó desengordurado restante e adicionaram-se 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 contendo 30% de 2 - metoxietanol e azida de sódio 0,01% (p/v). Repetiu-se o procedimento anterior de extração e obteve-se um segundo volume de extrato bruto (extrato bruto 2) de 200 mL.

Os dois volumes de extrato bruto foram submetidos às dosagens de proteínas e de atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan. Em seguida, os dois volumes de extratos brutos foram dialisados a 4 °C, separadamente, contra 4 litros de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v) durante 18 horas e novamente dialisados com mais 4 litros de tampão fosfato por mais 18 horas. O volume final do primeiro extrato bruto, após a diálise, foi de 260 mL. O

volume final do segundo extrato bruto, após a diálise, foi de 240 mL. Após a diálise, os extratos brutos, separadamente, foram novamente centrifugados durante 30 minutos a 9000 rpm a 4°C na mesma centrífuga. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada de cada extrato bruto para as determinações de proteínas e de atividade amidásica da rK1 com o substrato Bz-Arg-Nan.

3.3.3 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose

O primeiro extrato bruto dialisado, 260 mL, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose (2,8 cm x 11,5 cm) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v) e mantida a 4°C. Após a aplicação do extrato bruto, aplicaram-se à coluna 400 mL do tampão de equilíbrio para a sua lavagem exaustiva. Recolheram-se frações de aproximadamente 7 mL que foram submetidas à análise do teor de proteínas pela leitura da absorvância em 280 nm e à determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

A eluição das proteínas, que ficaram ligadas ao gel, foi realizada aplicando-se à coluna 250 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo NaCl 0,5 M e azida de sódio 0,01% (p/v). A coluna, mantida a 4°C, foi desenvolvida com o fluxo de 90 mL/hora.

Posteriormente, o gel de DEAE-Sepharose foi regenerado aplicando-se à coluna 70 mL de tampão acetato de sódio 1 M, 105 mL de hidróxido de sódio 0,5

M e finalmente 70 mL de tampão acetato de sódio 1 M, respectivamente. Em seguida, equilibrou-se a coluna aplicando-lhe 250 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v). Posteriormente, aplicou-se à coluna o segundo extrato bruto, 240 mL. As frações, de aproximadamente 7 mL foram igualmente recolhidas e submetidas à análise do teor de proteínas pela leitura da absorvância em 280 nm e à determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

As frações com atividade amidásica, contendo a rK1, resultantes das duas cromatografias, foram reunidas formando-se dois volumes, um de 56 mL para a cromatografia do primeiro extrato bruto e 64 mL para a cromatografia do segundo extrato bruto. Os dois volumes foram submetidos às dosagens de proteínas e de atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan e armazenados congelados em freezer a -20°C para posterior cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.

3.3.4 Preparação da coluna de Sepharose-aprotinina

A Sepharose-aprotinina foi preparada segundo Geiger e Fritz, (1981). Quinze gramas de Sepharose 4-B ativada pelo brometo de cianogênio foram colocados em funil de vidro com filtro de sílica montado em um kitasato de 1 litro e lavados com 3 litros de HCl 0,001 M pH 3,0 sob vácuo. Em um béquer, pesou-se 380 mg de aprotinina que foram dissolvidos em 40 mL de tampão NaHCO_3 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 8,3. As duas preparações foram misturadas e colocadas em um recipiente âmbar de boca larga e submetidas à

agitação em temperatura ambiente durante a noite em agitador automático. Após a agitação, a preparação foi filtrada a vácuo e o filtrado separado para posterior análise. O gel, no funil, foi lavado com 60 mL de tampão NaHCO_3 0,1 M com NaCl 0,5 M pH 8,3.

Uma alíquota do lavado foi separada para dosagem de proteínas segundo Bradford e Peterson (1983).

À preparação foram adicionados 60 mL de etanolamina 1 M e a mistura foi agitada durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi lavada a vácuo com 3 litros de tampão NaHCO_3 0,1 M com NaCl 0,5 M pH 8,3.

À Sepharose-aprotinina seca foi adicionado tampão glicina 0,2 M com NaCl 0,075 M pH 9,0 e o gel foi empacotado na coluna. Lavou-se a coluna com 100 mL do tampão glicina 0,2 M com NaCl 0,75 M e azida de sódio 0,01% (p/v).

3.3.5 Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina

Os dois volumes com atividade amidásica eluídos da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose foram reunidos formando um único volume com 120 mL. Uma alíquota foi retirada para as dosagens de proteínas e atividade amidásica.

O volume restante foi dialisado contra 3 litros de tampão glicina 0,2 M pH 9,0 com NaCl 0,75 M durante 25 horas. Após a diálise, uma alíquota foi retirada para as dosagens de atividade amidásica e proteínas. O volume final após a diálise foi de 140 mL.

Este material, de 140 mL, foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina (2 cm x 12 cm) equilibrada em tampão glicina 0,2 M pH 9,0 com NaCl 0,75 M contendo azida de sódio 0,01% (p/v) e mantida a 4°C. Em seguida, aplicaram-se à coluna 200 mL do tampão de equilíbrio para a sua lavagem exaustiva. Recolheram-se frações de aproximadamente 8 mL em tubos de ensaio que foram submetidas à análise do teor de proteínas pela leitura da absorvância em 280 nm e à determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

Para a eluição da rK1, adicionou-se à coluna de Sepharose-aprotinina 100 mL de tampão acetato de sódio 0,025 M contendo NaCl 1 M pH 3,5 e azida de sódio 0,01% (p/v). Coletaram-se frações de 2,5 mL em tubos contendo 500 µL de tampão Tris-HCl 2 M pH 8,5. As frações foram analisadas quanto à absorção em 280 nm e à atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

Em seguida, a coluna foi regenerada aplicando-lhe 100 mL de solução de uréia 6 M seguida de 200 mL do tampão de equilíbrio.

As frações que continham a rK1 foram agrupadas (170 mL) e a solução resultante foi dialisada contra água Milli-Q contendo azida de sódio 0,01% durante 21 horas e armazenada em freezer – 20°C. Uma alíquota foi retirada para dosagens de proteínas e atividade amidásica.

3.3.6 Cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC

O material, contendo a rK1, eluído da cromatografia em coluna de Sepharose-aprotinina e dialisado contra a água Milli-Q contendo azida de sódio 0,01%, foi submetido à liofilização. Desta forma, 170 mL de amostra foi colocada em um béquer e o mesmo foi tampado com papel alumínio e vedado com fita adesiva. O papel de alumínio foi perfurado em diversos pontos. Congelou-se a amostra em nitrogênio líquido. A temperatura durante o processo de liofilização foi de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O pó liofilizado foi dissolvido em 5 mL de tampão NaH_2PO_4 0,05 M contendo NaCl 0,1 M e azida de sódio 0,01% pH 6,5.

A solução foi submetida à cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR (10 mm x 30 cm) em equipamento FPLC equilibrada em tampão NaH_2PO_4 0,05 M contendo NaCl 0,1 M e azida de sódio 0,01% pH 6,5. Foram recolhidas frações de 1,0 mL em microtubos do tipo Eppendorf. As frações foram analisadas pela absorção em 280 nm e pela atividade amidásica em 410 nm.

As frações que continham rK1 foram agrupadas (9 mL) e armazenadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

3.4 Métodos para a avaliação da pureza e determinação do peso molecular aparente da rK1

A etapa para a avaliação da pureza e determinação do peso molecular aparente da rK1 foi feita em colaboração com a Dra. Luciana Pereira Xavier no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas (Lab. Marcos Luiz dos Mares-Guia) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG.

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para o preparo da amostra, as proteínas foram reduzidas e alquiladas com DTT e iodoacetamida (em condições térmicas desnaturantes), respectivamente, de acordo com o método modificado de STONE e WILLIAMS (1996), antes de serem aplicadas na eletroforese para que as ligações dissulfetos não interferissem na análise por espectrometria de massa, impedindo a separação de peptídeos que poderiam estar interligados por essas ligações. O tratamento de redução e alquilação consistiu em dissolver as amostras em 20 μL de tampão NH_4HCO_3 0,4 M contendo Uréia 8 M, posteriormente 5 μL de DTT 45 mM foram adicionados e as amostras incubadas a 50°C durante 15 min. Após resfriamento foram adicionados 5 μL de iodoacetamida 100 mM às amostras que foram novamente incubadas por 15 min à temperatura ambiente, no escuro.

A enzima purificada foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente de 5 a 15% na presença de SDS (0,1%) (WESTERMEIER, 2001) seguindo metodologia de LAEMMLI (1970); O experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 80 min, à temperatura ambiente. O gel foi corado pela coloração coloidal com *Coomassie Blue* G-250 (NEUHOFF et al., 1988). A coloração coloidal utilizada nos experimentos de SDS-PAGE foi escolhida de acordo com o menor *background* produzido, por sua sensibilidade estar em torno de 10 a 30 ng e pela compatibilidade com a técnica de espectrometria de massa (NEUHOFF et al., 1988; WESTERMEIER, 2001). Os padrões de massas moleculares utilizados foram adquiridos da Sigma[®] (code SDS6H2).

Após a corrida eletroforética a banda corada pelo método coloidal, amostra reduzida e alquilada, foi excisada com auxílio de lâmina de bisturi nº 15 individualmente do gel, descorada com acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, desidratada com acetonitrila 100%, seca em Speed vac e posteriormente tratada com a enzima tripsina (Promega[®]) *over-night* a 37°C de 16 a 24 h. Os peptídeos resultantes da tripsinólise foram dessalinizados através de micropurificação em ZipTips[®] C18 (Millipore-Bedford, EUA), seguindo recomendações dos fabricantes, e posteriormente analisados por espectrometria de massa.

3.4.2 Espectrometria de massa

Para as análises de espectrometria de massa foi utilizado o Espectrômetro de Massa sistema MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Alemanha). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra de rK1 reduzida, alquilada e tripsinolisada, e 0,5 µL de matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) em uma placa MTP *AnchorChip* 800/384.

Nas análises com o equipamento MALDI utilizam-se matrizes específicas para cada circunstância de análise; A CHCA é utilizada para se visualizar peptídeos menores do que 8 kDa, lípidos e carboidratos (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Os espectros de MS (espectrometria de massa) e MS/MS (espectrometria de massa em *tandem*) foram obtidos no modo positivo, o modo de operação da aquisição foi *Refletido*, *Laser repetition rate* a 50 Hz, *Ion source voltage 1* a 20 kV, *Ion source voltage 2* a 18,3 kV, *Ion source lens voltage* 6,75 kV e *number of shots* de 200. Para a fragmentação de peptídeos tripsinolisados no PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) foi empregado o método CID (*Collision induced dissociation*).

Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga para cada amostra utilizando-se o programa FlexControl 3.0. As análises dos conjuntos de dados adquiridos foram feitas com o auxílio dos programas FlexAnalysis 3.0 e Biotools 3.0 (conjunto de ferramentas de análise de espectros de massas, exemplo software MASCOT®). O aparelho foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I e IV* - Bruker Daltonics). O

Espectrômetro de Massa utilizado pertence ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais).

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa utilizando o *software* MASCOT® (PERKINS et al., 1999), o qual também compara massas de peptídeos observados com um banco de dados disponível de massas virtuais de peptídeos obtidos de proteínas proteolisadas *in silico* e faz a identificação das proteínas mais prováveis correspondentes às massas dos peptídeos observados; Este tipo de análise que foi utilizada denomina-se *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). O banco de dados utilizado nas análises foi do *Swissprot* 54.4 limitando-se as buscas ao gênero *Rattus*. As ferramentas de busca e análise comparativas de proteínas estão disponíveis na rede mundial de computadores: Expsy Ferramentas Proteômicas: <http://us.expasy.org/tools/> (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

3.5 Caracterização cinética da calicreína tecidual de rato

3.5.1 Titulação da rK1, em centro ativo, com a aprotinina

Para a titulação da rK1, em centro ativo, preparou-se uma solução estoque de aprotinina na concentração teórica de 10 mg/mL. A concentração real desta solução, 380 nM, foi determinada dividindo-se a sua absorvância em 280 nm pelo

valor da absorvância molar (ϵ_{280}) da aprotinina ($3800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (GREENE et al., 1966).

A partir desta solução estoque, prepararam-se soluções de uso de aprotinina em diferentes concentrações e avaliaram-se os seus efeitos sobre a atividade amidásica da calicreína rK1. Com os valores de atividade obtidos e os valores reais de aprotinina na reação, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada as absorvâncias em 410 nm e abscissa os valores das concentrações de aprotinina. Traçou-se a melhor reta entre os pontos. A partir da equação desta reta, calculou-se a concentração real de calicreína rK1 na reação e na solução estoque purificada.

3.5.2 Preparação das soluções de aprotinina

Uma solução estoque de aprotinina (MM = 6500) 380 nM foi preparada dissolvendo-se 5 mg em 5 mL de água Milli-Q. A solução foi distribuída em alíquotas de 1 mL em microtubos tipo Eppendorf e armazenadas a - 20 °C. A concentração teórica desta solução estoque era de 154 μM . A concentração real desta solução foi determinada dividindo-se a sua absorvância em 280 nm pelo valor da absorvância molar (ϵ_{280}) da aprotinina ($3800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (GREENE et al., 1966).

Para se avaliar o efeito das diversas concentrações da aprotinina sobre a atividade amidásica da calicreína (rK1) utilizaram-se soluções com concentrações variando de 10,4 nM a 34,6 nM.

3.5.3 Preparação das soluções do substrato (D-Val-Leu-Arg-Nan)

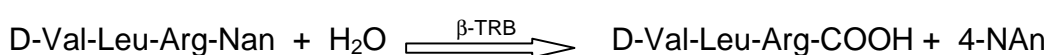
Preparou-se uma solução estoque do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan dissolvendo-se 25 mg em 4,3 mL de água milli-Q. A concentração teórica desta solução era de 10 mM. As soluções de uso do substrato, 120 a 640 μ M, eram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque, em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 contendo azida de sódio a 0,1 % (p/v). A concentração real da solução do substrato era determinada por hidrólise total com solução de beta tripsina bovina (β -TRB) fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG.

3.5.4 Determinação da concentração real do substrato

Para o ensaio da hidrólise total, preparava-se uma solução de uso da β -TRB, diluindo-se a 1/50 a solução estoque de 2 mg/mL em solução de HCl 10^{-3} M. Esta solução era mantida em banho de gelo.

Em seguida, a 900 μL de uma solução 10 μM do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, eram adicionados 100 μL da solução da β -TRB e as misturas, em quadruplicatas, eram incubadas durante 4 horas. As reações eram paralisadas em intervalos de 30 minutos, adicionando-se 100 μL de ácido acético a 60%. O controle (branco) continha 100 μL da solução de HCl 10^{-3} M, em substituição à solução de β -TRB. Após a adição do ácido acético, liam-se as absorvâncias das misturas em 410 nm, que eram convertidas em concentração real do substrato, dividindo-as pelo valor da absortividade molar da 4-NAn, um dos produtos finais da hidrólise. Dividindo-se o valor da concentração real da solução do substrato, determinada no ensaio, pelo valor da concentração teórica da solução do substrato, obtinha-se um fator (f). A concentração real da solução estoque do substrato era, então, calculada multiplicando-se o valor de sua concentração teórica pelo fator. O protocolo de ensaio para a hidrólise total do substrato está demonstrado no Quadro 3.

O fundamento da hidrólise do substrato catalisada pela β -TRB é:



Quadro 3 – Protocolo para a hidrólise total do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan com a β -tripsina

ETAPAS DE ADIÇÃO	AMOSTRA (μ L)	CONTROLE (BRANCO) (μ L)
SUBSTRATO	900	900
β -TRB	100	-
HCl 10^{-3} M	-	100
Banho-maria a 37°C		
ÁCIDO ACÉTICO	100	100

3.5.5 Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, na ausência e na presença da aprotinina

Para se avaliar o efeito das diversas concentrações do substrato, D-Val-Leu-Arg-Nan, sobre a velocidade da reação catalisada pela rK1, utilizaram-se soluções do substrato com concentrações de 120, 160, 200, 240, 360, 480 e 640 μ M, respectivamente.

Para zerar o espectrofotômetro era utilizado o tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v).

Nos ensaios cinéticos da inibição da rK1 pela aprotinina eram adicionados, à cubeta da amostra, 20 μ L da solução estoque de rK1 diluída 1/4 vezes e volumes crescentes (30, 50, 75 e 100 μ L) da solução de uso de aprotinina preparada em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v) e volumes adequados do tampão para completar o volume de 400 μ L, para se obter concentrações de aprotinina no ensaio de: 10,39; 17,32; 25,90 e 34,64; nM, respectivamente.

Quadro 4 – Protocolo para a cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, na ausência e na presença da aprotinina

ETAPAS DE ADIÇÃO	AMOSTRA (μL)	AMOSTRA (μL)	AMOSTRA (μL)	AMOSTRA (μL)	REFERÊNCIA (μL)
CALICREÍNA (rK1)	20	20	20	20	-
APROTIMINA	30	50	75	100	Volumes* correspondentes
TAMPÃO GLICINA	350	330	305	280	Volumes** correspondentes

Incubação durante 15 minutos a 37°C

S ₂₂₆₆	700	700	700	700	700
-------------------	-----	-----	-----	-----	-----

* 30, 50, 75 e 100 μL

** 370, 350, 325 e 300 μL

Na cubeta de referência eram adicionados apenas os volumes da solução de aprotinina acima mencionados, e os volumes adequados do tampão para completar 400 μL. As cubetas, com as misturas, eram colocadas nos respectivos compartimentos das cubetas do espectrofotômetro e eram pré-incubadas a 37 °C durante 15 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir, eram adicionados à cubeta de referência e à cubeta da amostra 700 μL da solução de uso do substrato com concentrações variando de 120 a 640 μM, preparada em tampão glicina 0,2 M pH 9,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v), previamente equilibrada a 37 °C. As misturas eram homogeneizadas e as cubetas eram recolocadas nos respectivos compartimentos do espectrofotômetro, termostatizados a 37 °C. As incubações eram realizadas em triplicata.

A diferença entre as absorvâncias das misturas de incubação, na cubeta da amostra e na cubeta de referência, era registrada durante 120 segundos e fornecida como $\Delta A_{410}/\text{min}$. Os valores de $\Delta A_{410}/\text{min}$ eram convertidos em velocidade de reação ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) utilizando-se a seguinte equação:

$$v = \Delta A_{410}/\text{min} \cdot 1/(\epsilon M \cdot [rK1]) \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \quad \text{Eq. 4}$$

onde,

v = velocidade da reação $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

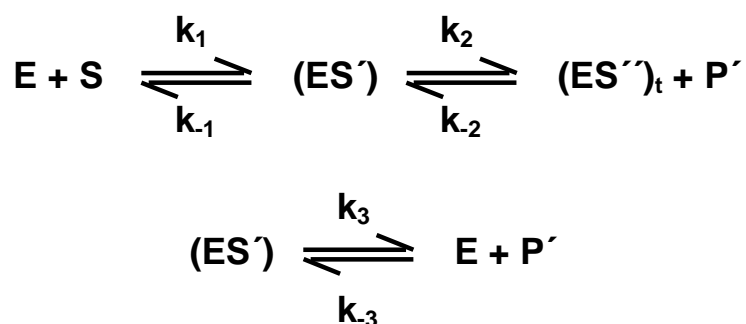
ΔA_{410} = diferença das absorvâncias em 410 nm por minuto

ϵM = absortividade molar da 4-NAn a 410 nm ($8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER et al., 1961)

$[rK1]$ = concentração real da rK1 (em centro ativo) no ensaio

3.5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para os cálculos dos parâmetros cinéticos seguiu-se o modelo clássico para a ação das enzimas proteolíticas segundo GUTFREUND & STURTEVANT (1956), citados por FUNATSU et al. (1972):



$(ES'')_t$ indica o estado de transição

Segundo este modelo, para a hidrólise de amida, como o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, a etapa determinante é a acilação, com a formação do intermediário acil enzima, cuja constante de velocidade é k_2 . Neste caso, o k_{cat} é definido como $k_2/[E_0]$, onde $[E_0]$ = concentração molar da enzima.

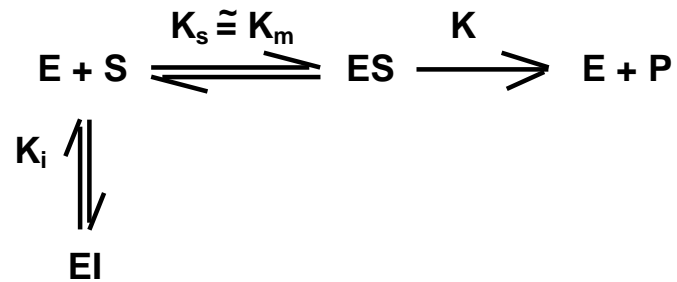
Quando o substrato é uma p-nitroanilida, K_m pode ser aproximado ao valor de K_s , pois;

$$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1, \text{ como } k_{-1} \gg k_2 \text{ tem-se que}$$

$$K_m = K_s = k_{-1}/k_1 \quad \text{Eq. 5}$$

De acordo com Cornish-Bowden (1981), o mecanismo mais simples para a inibição do tipo competitiva é aquele em que o inibidor, I, liga-se à enzima livre, E, com uma constante de inibição K_i , para formar o complexo enzima-inibidor, EI, que é incapaz de formar um produto. Neste tipo de inibição, o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação.

Portanto, segundo Cornish-Bowden, dados cinéticos para a inibição da rK1 pela aprotinina podem ser descritos pelo seguinte esquema:



A velocidade inicial, corrigida pela concentração da enzima, é dada pela seguinte equação:

$$\frac{v}{E_0} = v = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{[S] + K_m (1 + [I]/K_i)} \quad \text{Eq. 6}$$

De acordo com Cornish-Bowden (1981), o efeito de um inibidor competitivo é aumentar o valor aparente de K_m pelo fator $(1 + [I]/K_i)$, diminuir o valor de k_{cat}/K_m pelo mesmo fator e não alterar o valor de k_{cat} de acordo com as seguintes equações:

$$k_{cat}^{ap} = k_{cat} \quad \text{Eq. 7}$$

$$K_m^{ap} = K_m (1 + [I]/K_i) \quad \text{Eq. 8}$$

$$k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} = k_{cat}/K_m / (1 + [I]/K_i) \quad \text{Eq. 9}$$

De acordo com Plowman (1972), a inibição competitiva pode ser linear, parabólica ou hiperbólica. E, segundo o mesmo autor, quando se usa o termo competitivo simplesmente, assume-se que a inibição é do tipo linear.

Os dados experimentais foram tratados desenhando-se, preliminarmente, os gráficos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf, utilizando-se o programa Sigma Plot 8.0, de onde foram calculados os valores dos parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} .

O gráfico de K_m^{ap}/K_m versus a concentração de aprotinina foi desenhado utilizando-se o programa OriginPro 7.5, de onde foram calculados os valores das constantes de inibição K_i e K_{ii} .

O gráfico de Lineweaver-Burk é a linearização da equação de Michaelis-Menten e o gráfico de Hanes-Woolf é uma linearização da equação de Lineweaver-Burk.

A análise estatística usando o programa Graph Pad com nível de confiança de 95% revelou que os pontos não estavam significativamente unidos por uma reta, o que reforça a interpretação da inibição do tipo parabólica.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação da calicreína tecidual de rato rK1

A purificação da calicreína tecidual de rato rK1 foi realizada em quatro etapas: a) preparação do extrato bruto; b) cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose; c) cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina e d) cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos no processo de purificação da rK1.

ETAPA 1 – Foram preparados dois extratos brutos que apresentaram atividade amidásica específica sobre o substrato Bz-Arg-Nan de $221 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ e $169 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

ETAPA 2 - Os dois extratos brutos foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose. Nesta etapa uma grande quantidade de proteínas inespecíficas foi separada, com aumentos da atividade amidásica específica de 221 para $708 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ e 169 para $2057 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

O perfil obtido da cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose, de 2,0 g do extrato bruto 1, contendo 68,2 mg de proteína, está mostrado na Figura 5. Dois componentes protéicos denominados, D1 e D2, foram separados. O material D1 não se combinou com a DEAE-Sepharose, sendo eluído com o tampão de equilíbrio. O material D2¹ foi eluído com o tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0

contendo NaCl 0,5 M e azida de sódio 0,01% (p/v). O material D2¹ apresentou atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

O material contido no pico D2¹ foi usado na etapa seguinte para a purificação da enzima. Este material continha 12,8 mg de proteínas com atividade amidásica específica três vezes maior do que a do extrato bruto 1 e foi obtido com um rendimento de 60% (Tabela 1).

O extrato bruto 2, submetido à mesma cromatografia na coluna de DEAE-Sepharose, apresentou um perfil de eluição semelhante (resultado não mostrado). O material contido no pico D2² da segunda cromatografia em DEAE-Sepharose continha 4,9 mg de proteína com atividade amidásica específica doze vezes maior do que a do extrato bruto 2 e foi obtido com um rendimento de 64%,

ETAPA 3 – Após a mistura dos dois volumes eluídos da coluna de DEAE-Sepharose (D2¹ +D2²), o volume final (D3) foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina de forma que a atividade amidásica específica sobre o substrato aumentou para 2537 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

O perfil da cromatografia em coluna de Sepharose-aprotinina de 12,8 mg de proteína do material D3 está mostrado na Figura 6. A eluição do material combinado com a Sepharose-aprotinina era feita com tampão acetato de sódio 0,025 M contendo NaCl 1 M pH 3,5 e azida de sódio 0,01% (p/v). O material com atividade amidásica (D4) obtido nessa etapa foi treze vezes mais ativo do que o extrato bruto, com rendimento de 11%.

ETAPA 4 - A quarta e última etapa da purificação consistiu na cromatografia, do material D4 obtido na etapa anterior, de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC. A calicreína eluída (D5) apresentou atividade amidásica específica de $6236 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

A Figura 7 mostra o perfil obtido da cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC, de 0,6 mg de proteína do material D4 obtido na etapa anterior. A eluição do material (D5) contido no pico foi feita com tampão NaH_2PO_4 0,05 M contendo NaCl 0,1 M e azida de sódio 0,01%, pH 6,5. O pico eluído, apresentou-se 32 vezes mais ativo do que o extrato bruto e continha 0,1 mg da enzima pura, com rendimento final de 5%.

Assim, partindo-se de 143,6 mg de proteínas nos extratos brutos foram obtidos 102 μg da calicreína tecidual do rato purificada.

A Tabela 1 mostra os resultados da purificação da rK1.

Tabela 1 – Purificação da calicreína tecidual de rato (rK1) usando-se Bz-Arg-Nan como substrato para a medida da atividade amidásica

TRATAMENTO	PROTEÍNA mg	ATIVIDADE AMIDÁSICA ESPECÍFICA $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.	ATIVIDADE AMIDÁSICA TOTAL $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	FATOR DE PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO %
Extrato bruto 1	68,2	221	15072	1,0	100
Extrato bruto 2	75,4	169	12743	1,0	100
DEAE- Sepharose 1 (D2 ¹)	12,8	707	9050	3,2	60
DEAE- Sepharose 2 (D2 ²)	4,9	2057	10079	12,2	64
Sepharose- aprotinina (D4)	0,6	2537	1522	13,0	11
Superose 12 HR (D5)	0,1	6236	624	32,0	5

D₂¹ – material eluído da primeira cromatografia em DEAE-sepharose; D₂² – material eluído da segunda cromatografia em DEAE-sepharose; D4 – material eluído da cromatografia em Sepharose-aprotinina; D5 – material eluído da cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC

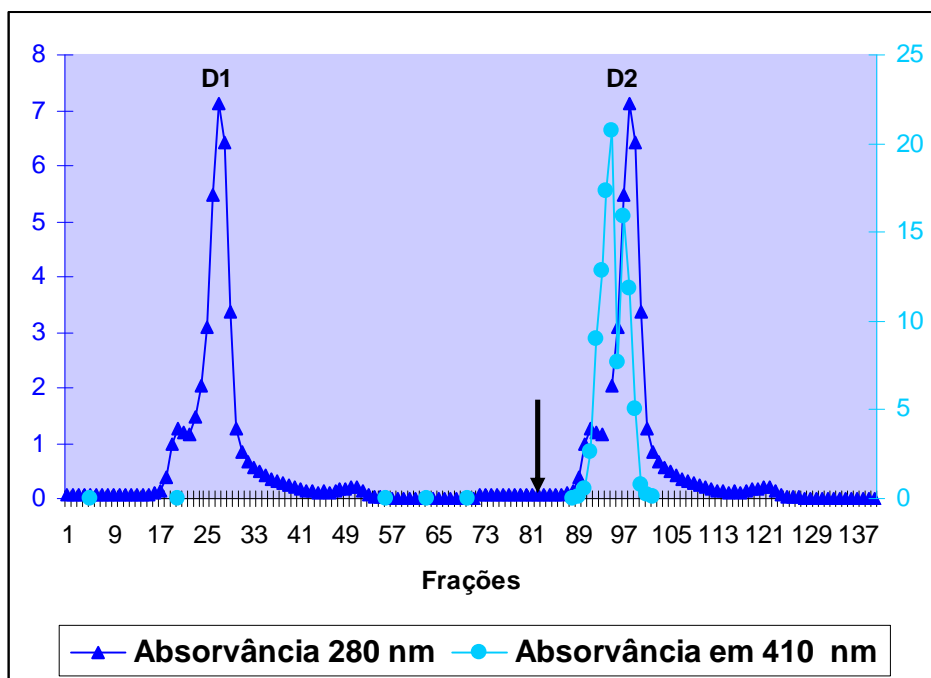


Figura 5 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose

Condições: coluna (2,8 cm x 11,5 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo azida de sódio 0,01% (p/v) e mantida a 4°C. A amostra aplicada – extrato bruto 1 – continha 68,2 mg de proteínas. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e a calicreína foi eluída pela aplicação do tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo NaCl 0,5 M e azida de sódio 0,01% (p/v). A seta indica o início da eluição. Fluxo 90 mL/hora. Volume das frações: 7,0 mL. Para maiores detalhes vide Materiais e Métodos.

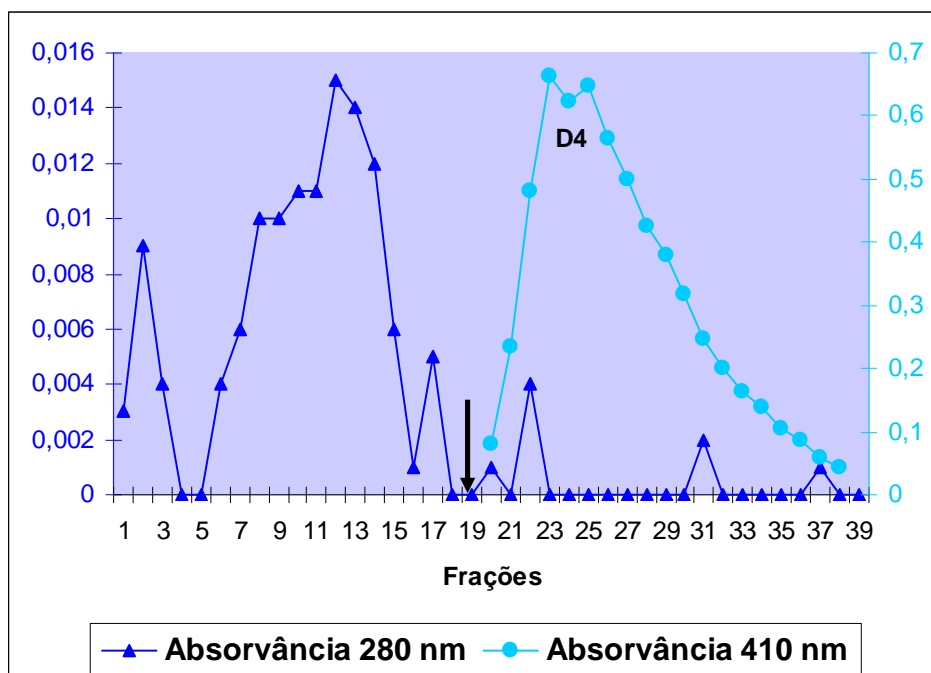


Figura 6 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina

Condições: coluna (2 cm x 12 cm) equilibrada em tampão glicina 0,2 M pH 9,0 com NaCl 0,75 M contendo azida de sódio 0,01% (p/v) e mantida a 4°C. A amostra aplicada continha 17,7 mg de proteínas. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e a calicreína foi eluída com tampão acetato de sódio 0,025 M contendo NaCl 1 M pH 3,5 e azida de sódio 0,01%. As frações eram colhidas em tubos contendo 500 μ L de tampão Tris-HCl 2 M pH 8,5. A seta indica o início da eluição. Volume das frações: 2,5 mL. Para maiores detalhes vide Materiais e Métodos.

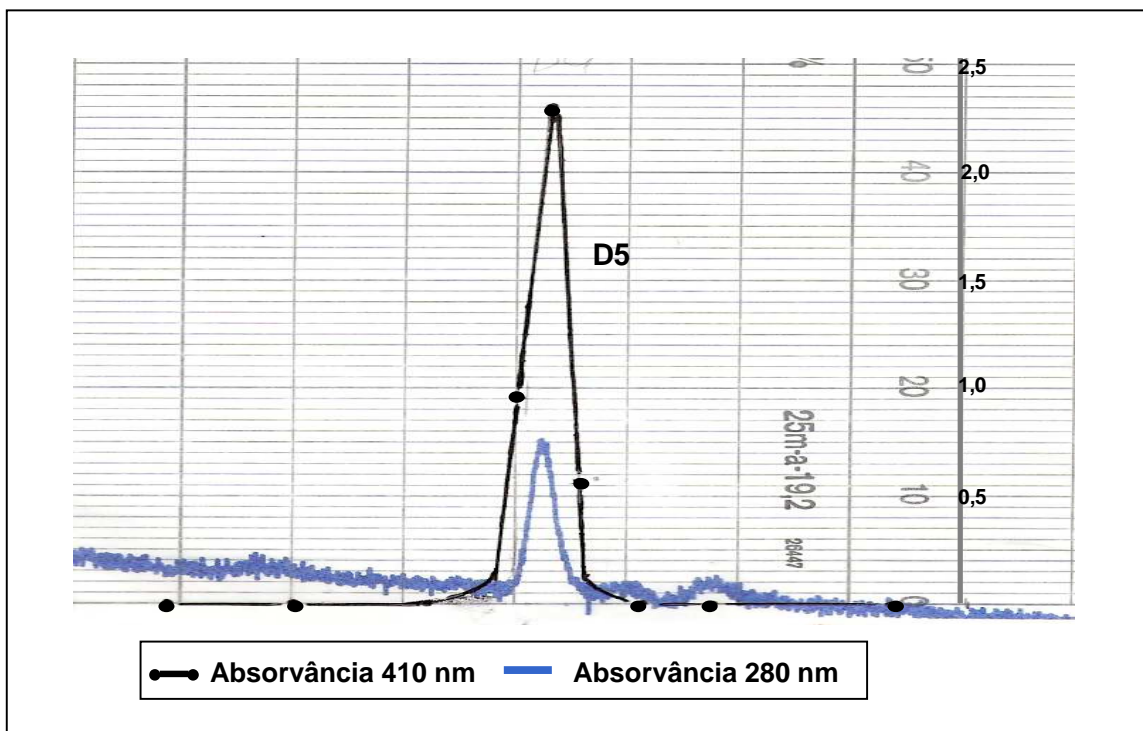


Figura 7 – Cromatografia de filtração em gel da rK1 em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC

Condições: coluna (10 mm x 30 cm) equilibrada em tampão NaH_2PO_4 0,05 M contendo NaCl 0,1 M e azida de sódio 0,01% pH 6,5. A amostra aplicada continha 0,6 mg de proteínas. Fluxo 30 mL/hora. Volume das frações: 1,0 mL. Para maiores detalhes vide Materiais e Métodos.

4.2 Critérios de pureza e massa molecular

Os perfis eletroforéticos, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 5-15%, da preparação da rK1 purificada, da rK1 reduzida com ditioneitol (DTT) e alquilada com iodoacetamida e dos padrões de massas moleculares utilizados estão mostrados na Figura 8.

Observa-se que a rK1 mostrou uma banda única (canaleta 2) com massa molecular de 28 kDa na eletroforese, indicando a pureza e a homogeneidade da preparação. A rK1 reduzida e alquilada também mostrou uma banda única de massa molecular 47,7 kDa, indicando que a rK1 é constituída de uma única cadeia polipeptídica. A massa molecular maior é resultante da desnaturação da enzima.

O perfil da espectrometria de massa da rK1 reduzida e alquilada está mostrado na Figura 9.

Observa-se um pico único com massa molecular de 28.833 Da, indicando a pureza e a homogeneidade da preparação da rK1.

A análise comparativa do perfil de massa molecular, da amostra obtida por espectrometria de massa, utilizando o *software* MASCOT[®] com o banco de dados *Swissprot* 54.4, revelou um escore de 34, caracterizando a homologia da amostra com a proteína KLK1_RAT do *Rattus norvegicus*.

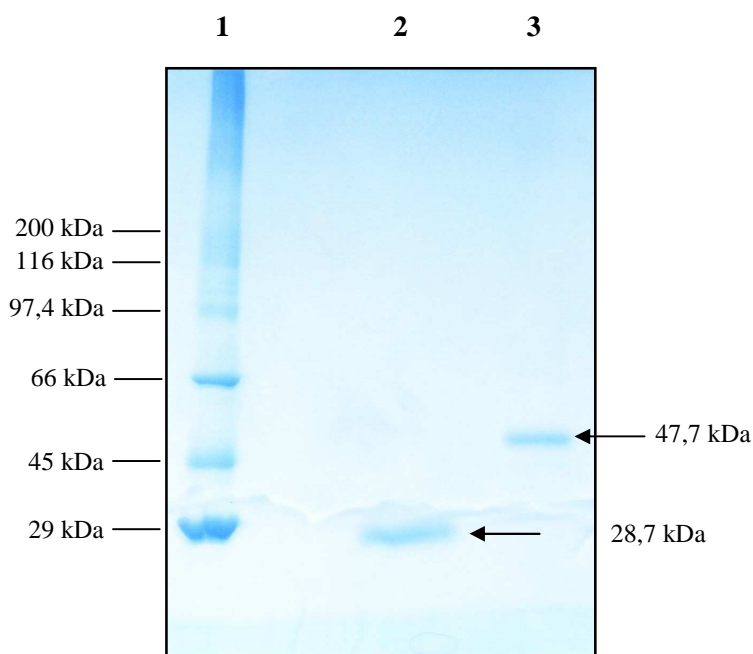


Figura 8 - Eletroforese da rK1 em gel de poliacrilamida com gradiente 5-15% e SDS

Canaleta 1 – Marcadores de massa molecular. Canaleta 2 – rK1 após cromatografia de afinidade (13 μ g). Canaleta 3 – rK1 após cromatografia de afinidade (13 μ g) reduzida com DTT e alquilada com iodoacetamida. Coloração: método coloidal com *Coomassie Blue*. Marcadores de Massa Molecular: Sigma code SDS6H2 - Miosina porcina 200 kDa; β -galactosidase de *E. coli* 116 kDa; Fosforilase b de músculo de coelho 97,4 kDa; BSA 66 kDa; Ovalbumina 45 kDa; Anidrase carbônica de eritrócito bovino 29 kDa.

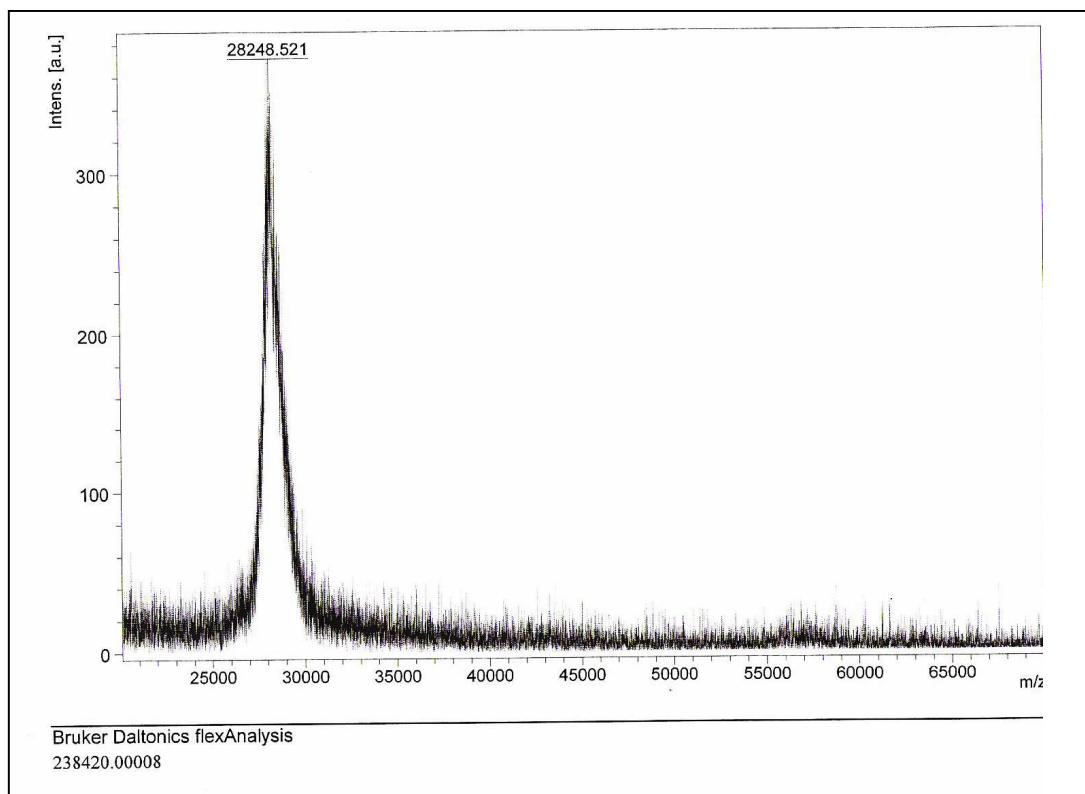


Figura 9 – Espectrometria de massa

4.3 Titulação da rK1, em centro ativo, com a aprotinina

A Figura 10 mostra a reta correspondente aos valores de absorvância em 410 nm obtidos e os valores das concentrações de aprotinina na reação de titulação. A partir da equação desta reta, calculou-se a concentração real da rK1 na reação e também da solução estoque da rK1 purificada. O valor encontrado para a concentração da enzima foi de 69,2 nM na reação e 692 nM na solução estoque. Para maiores detalhes vide Materiais e Métodos.

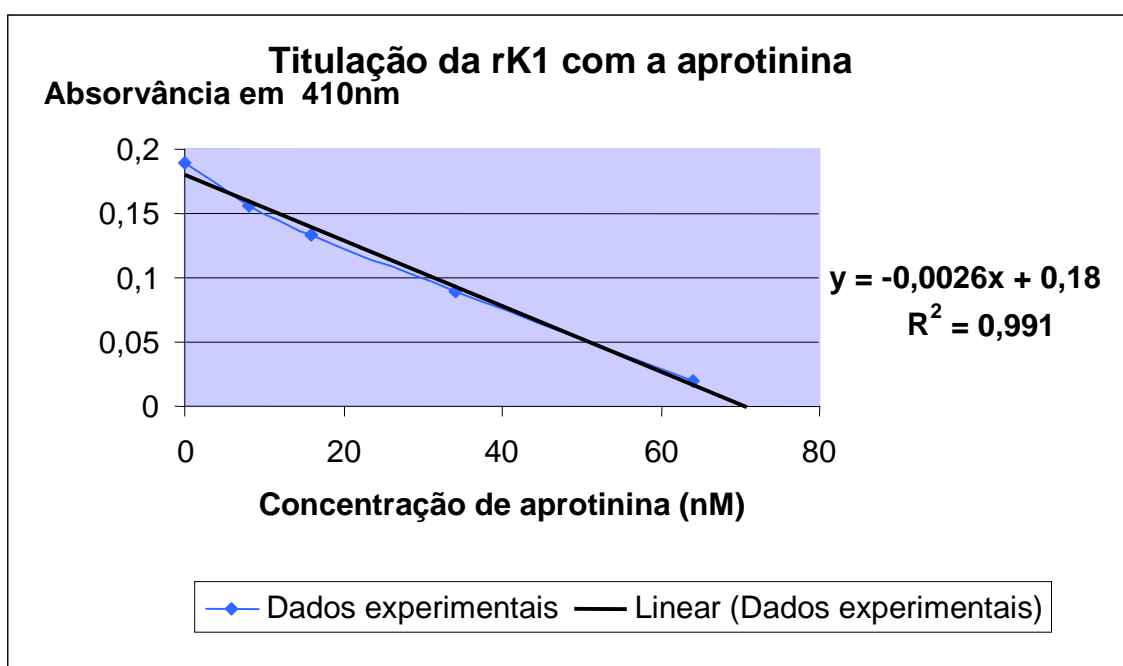


Figura 10 – Gráfico para a determinação da concentração da rK1 em centro ativo

4.4 Inibição da atividade amidásica da caliceína tecidual de rato (rK1) pela aprotinina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

A hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, seguiu a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentrações do substrato utilizadas (120 a 640 μM). A Figura 11 mostra o gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan (120 a 640 μM), catalisada pela rK1, na ausência e na presença de diferentes concentrações de aprotinina (10,4 a 34,6 nM). Neste gráfico, observa-se a diminuição das velocidades de hidrólise do substrato catalisadas pela rK1, na presença de concentrações crescentes de aprotinina.

Cada ponto deste gráfico, e dos demais apresentados neste trabalho, representa a média de determinações em triplicatas.

A Figura 12 mostra o gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença das diferentes concentrações de aprotinina. Observa-se que as retas convergem-se para um mesmo ponto no eixo das ordenadas, indicando que a inibição da rK1 pela aprotinina é do tipo competitiva. As retas foram calculadas por regressão linear utilizando-se todos os dados e com um único valor de intercepto ($1/k_{\text{cat}}$). Neste gráfico, as inclinações das retas representam os valores de K_m/k_{cat} de acordo com a equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_{\text{cat}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{\text{cat}}} \quad \text{Eq. 10}$$

A Figura 13 mostra o gráfico de Hanes-Woolf para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença das diferentes concentrações de aprotinina. Observa-se que as retas, correspondentes à ausência e à presença da aprotinina, nas quatro concentrações utilizadas no ensaio, são paralelas. Neste gráfico, os interceptos (na ordenada) correspondem aos valores de K_m/k_{cat} e as inclinações das retas correspondem ao valor de $1/k_{cat}$, de acordo com a seguinte equação de Hanes-Woolf:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{k_{cat}} [S] + \frac{K_m}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 11}$$

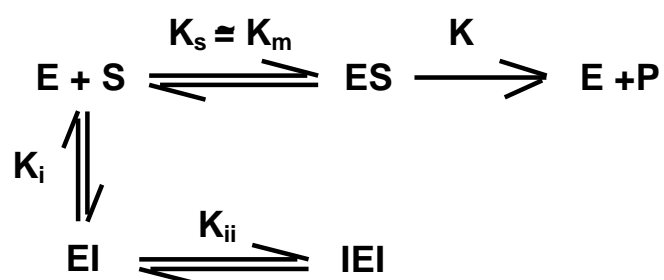
O gráfico mostra que as retas correspondentes às diferentes concentrações de aprotinina, possuem a mesma inclinação ($1/k_{cat}$) que a reta obtida na ausência de aprotinina, caracterizando e confirmando a inibição do tipo competitiva.

A Figura 14 mostra o gráfico dos valores de K_m^{ap} e k_{cat}^{ap} em função da concentração de aprotinina. Observa-se que o valor de K_m^{ap} aumenta parabolicamente à medida que a concentração de aprotinina aumenta, enquanto que os valores de k_{cat} permanecem aproximadamente constantes dentro do erro experimental. Este resultado indica que a inibição da rK1 pela aprotinina é competitiva parabólica.

A Figura 15 mostra o gráfico dos valores de K_m^{ap}/K_m , obtidos das análises dos dados segundo os modelos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-

Woolf, *versus* a concentração de aprotinina. A curva mostrada é uma parábola, indicando assim, que a inibição competitiva é do tipo parabólica.

Após ter-se conhecimento do tipo de inibição competitiva pelos métodos gráficos, foi proposto o seguinte modelo cinético para a inibição competitiva parabólica da rK1 pela aprotinina:



A partir deste esquema, obtém-se a seguinte equação para a velocidade inicial da reação:

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{v}{[E_0]} = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{[S] + K_m (1 + [I]/K_i) + K_m \cdot [I]^2 / K_i \cdot K_{ii}} \quad \text{Eq. 12}$$

A partir da equação acima, tem-se a equação correspondente de Lineweaver-Burk (Eq 13), que por sua vez origina a equação de Hanes-Woolf (Eq.14):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_m [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})]}{k_{cat}} \frac{1}{[S]} \quad \text{Eq. 13}$$

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{k_{cat}} [S] + \frac{K_m [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})]}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 14}$$

A Tabela 2 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos k_{cat}^{ap} e K_m^{ap} para as hidrólises do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, na ausência e na presença da aprotinina.

Observam-se os valores de k_{cat}^{ap} são aproximadamente constantes, dentro do erro experimental, enquanto que os valores de K_m^{ap} aumentam à medida que a concentração de aprotinina aumenta.

Conhecendo-se os valores de K_m e K_m^{ap} obtidos a partir do gráfico de Michaelis – Menten, calcularam-se os valores de K_i e K_{ii} , utilizando-se a regressão quadrática:

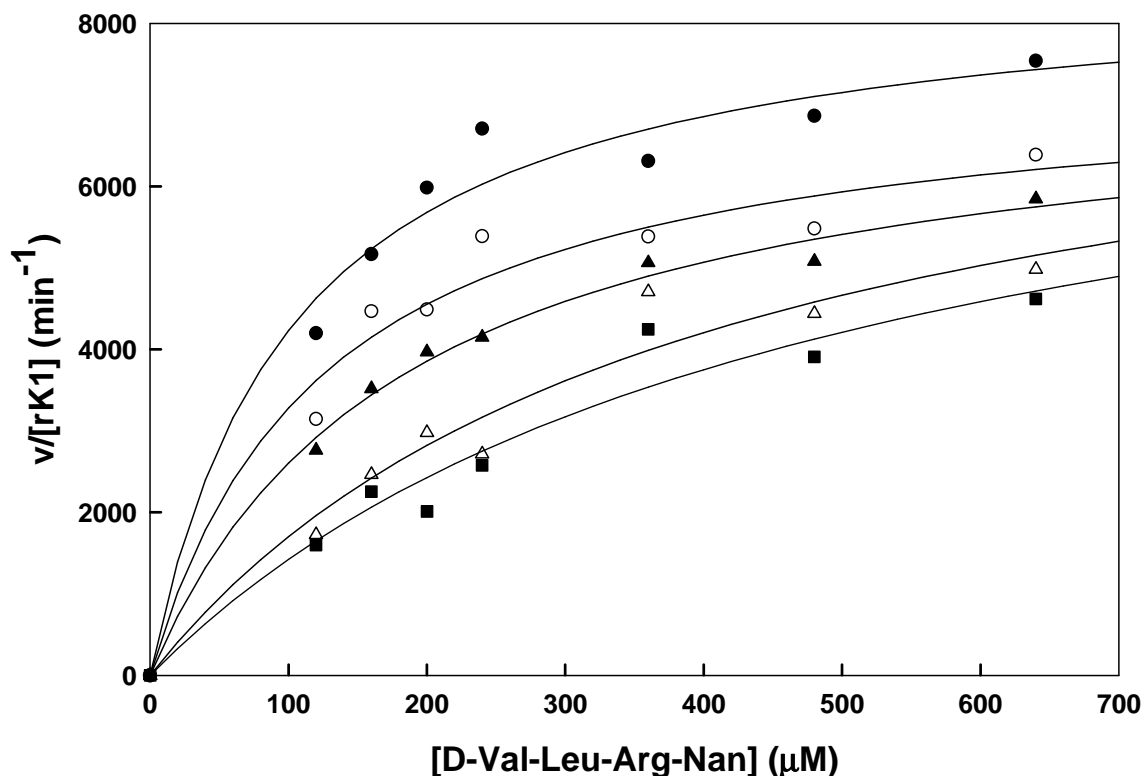
$$y = 1,0 + ax + bx^2 \quad \text{Eq. 15}$$

$$y = 1,0 + a[I] + b[I]^2 \quad \text{Eq. 16}$$

$$K_m^{ap} = K_m (1 + [I]/K_i + [I]^2/K_i \cdot K_{ii}) \quad \text{Eq. 17}$$

$$K_m^{ap}/K_m = (1 + [I]/K_i + [I]^2/K_i \cdot K_{ii}) \quad \text{Eq. 18}$$

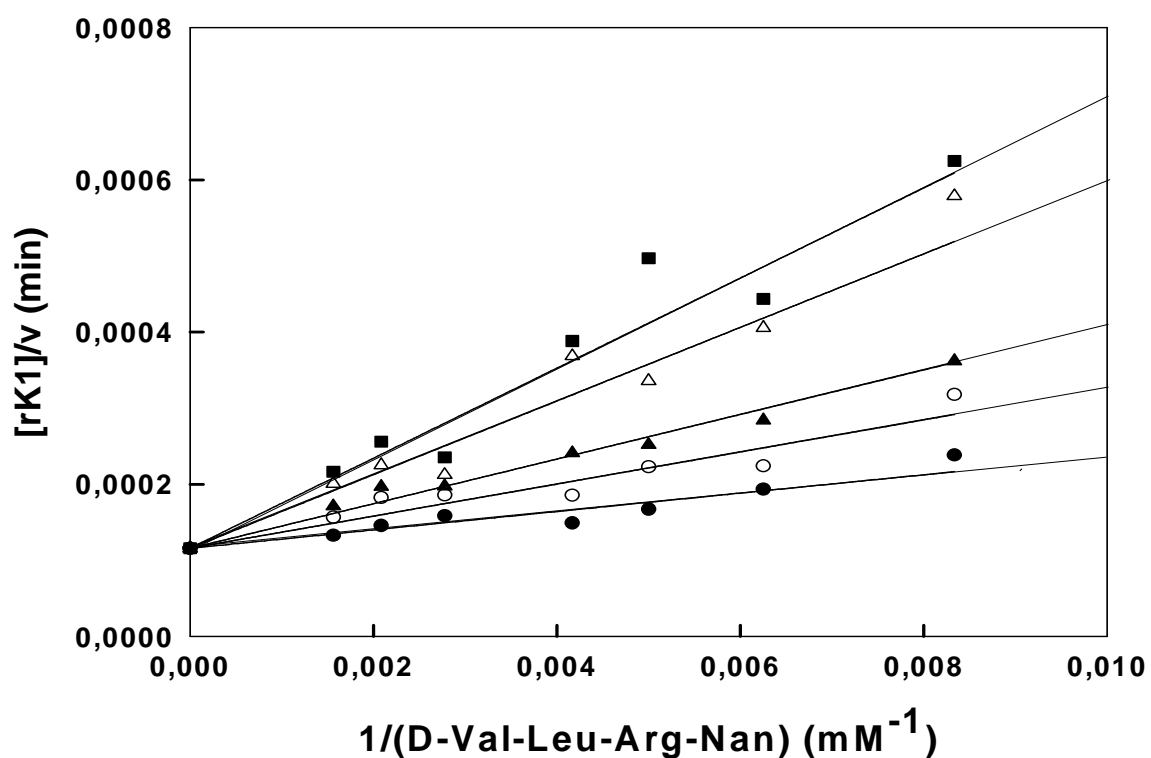
Os valores de K_i e K_{ii} estão expressos na Tabela 3.



Legenda

- Aprotinina 0,0
- Aprotinina 10,4 nM
- ▲ Aprotinina 17,3 nM
- △ Aprotinina 26,0 nM
- Aprotinina 34,6 nM

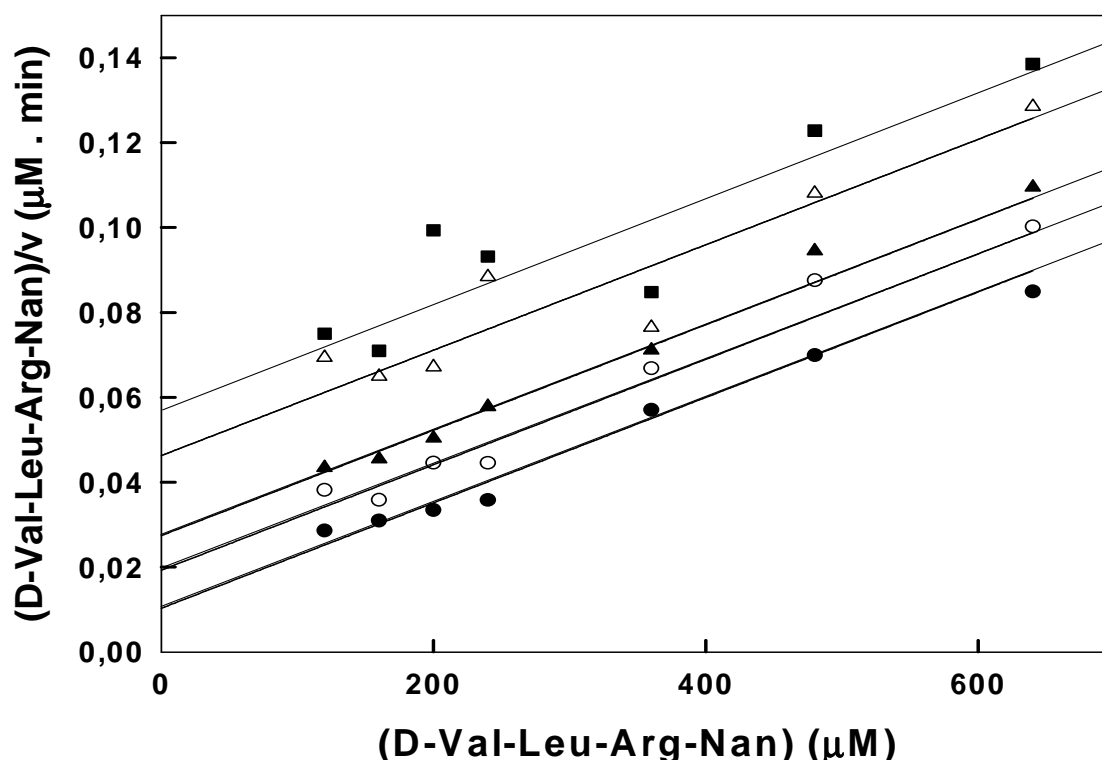
Figura 11 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina (Maiores detalhes, página 71).



Legenda

- Aprotinina 0,0
- Aprotinina 10,4 nM
- ▲ Aprotinina 17,3 nM
- △ Aprotinina 26,0 nM
- Aprotinina 34,6 nM

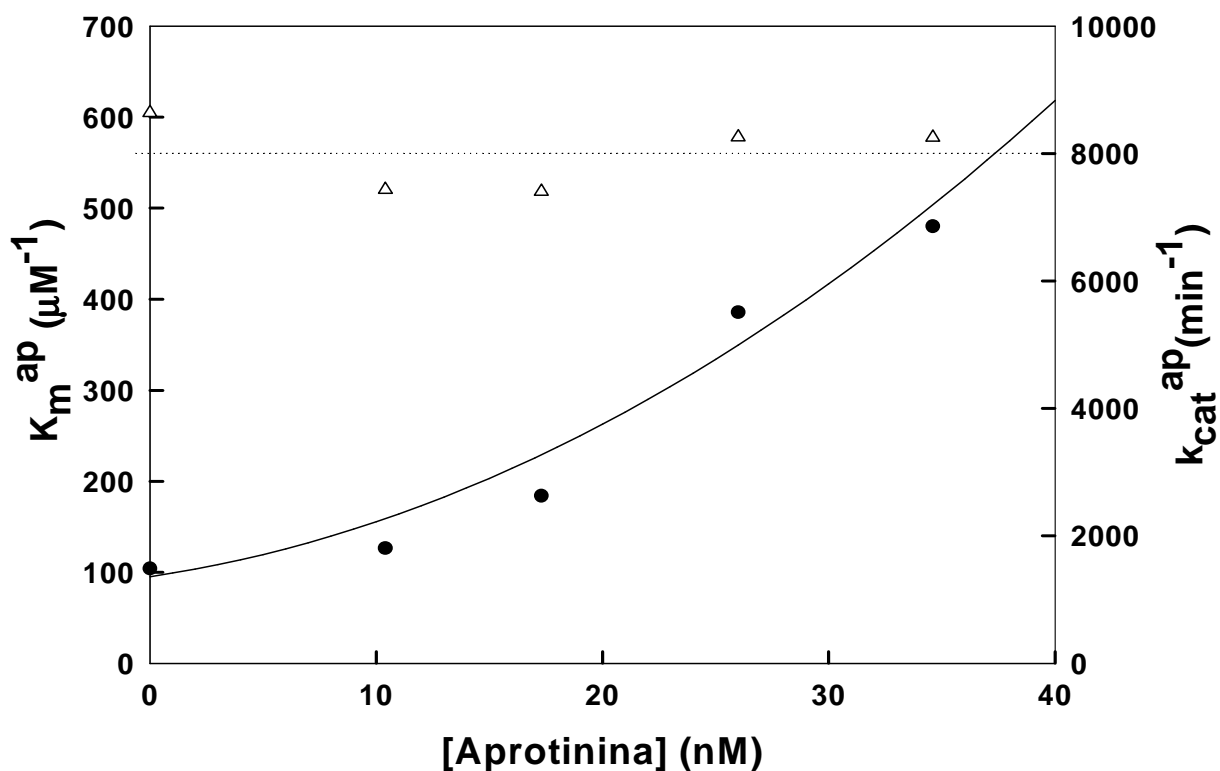
Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina (Maiores detalhes, página 104).



Legenda

- Aprotinina 0,0
- Aprotinina 10,4 nM
- ▲ Aprotinina 17,3 nM
- △ Aprotinina 26,0 nM
- Aprotinina 34,6 nM

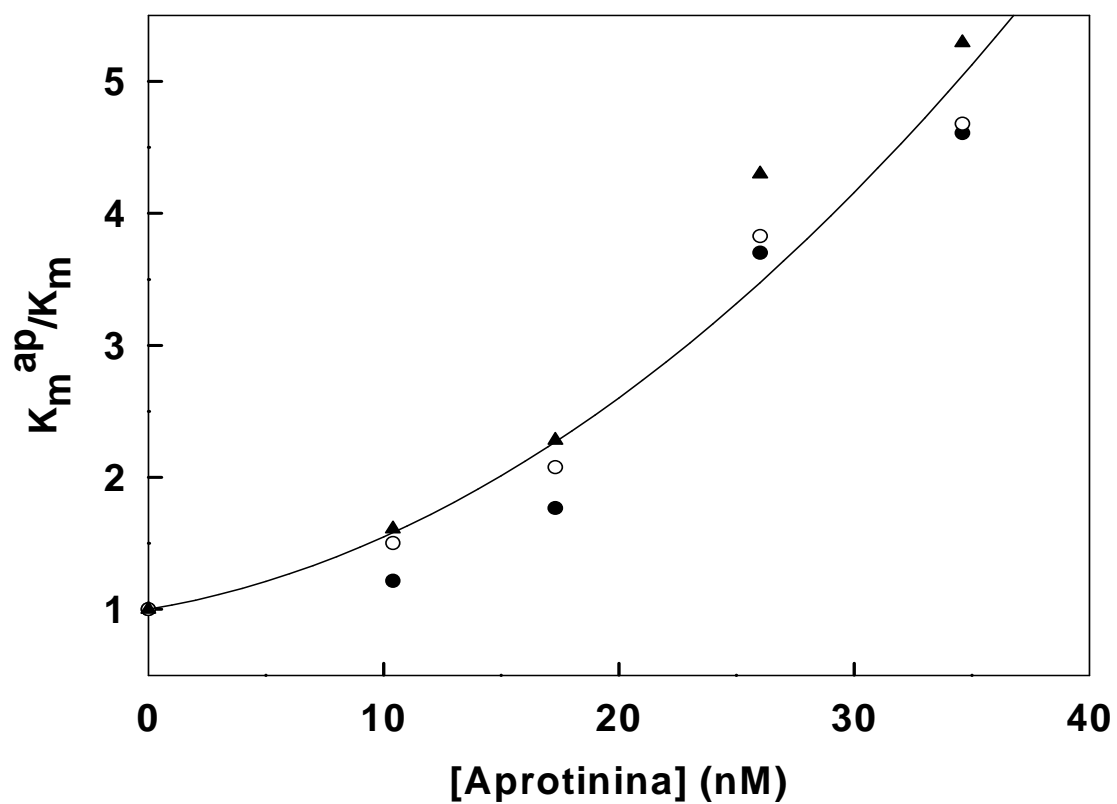
Figura 13 – Gráfico de Hanes-Woolf para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela calicreína tecidual de rato, na ausência e na presença de aprotinina (Maiores detalhes, página 86).



Legenda

- K_m
- △ k_{cat}

Figura 14 – Gráfico de K_m^{ap} e k_{cat} versus a concentração de aprotinina (Maiores detalhes, Tabela 2, página 94).



Legenda

- ▲ K_m^{ap}/K_m Hanes-Woolf
- K_m^{ap}/K_m Lineweaver-Burk
- K_m^{ap}/K_m Michaelis-Menten

Figura 15 – Gráfico dos parâmetros cinéticos K_m^{ap}/K_m da rK1 em função da concentração de aprotinina (Maiores detalhes, página 104).

Tabela 2 – Valores dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença de aprotinina segundo os modelos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf

Inibidor	Parâmetro	$k_{cat}^{ap} \pm EP$ (min^{-1})		$K_m^{ap} \pm EP$ (μM)	
		MM	LB	LB	HW
Aprotinina (nM)					
0		8641 ± 572	$104,2 \pm 24,6$	104,4	93,4
10,4		7433 ± 576	$126,6 \pm 31,4$	156,8	168,4
17,3		7402 ± 318	$184,1 \pm 20,9$	216,8	236,6
26,0		8259 ± 1409	$385,7 \pm 126,7$	399,5	394,7
34,6		8252 ± 1731	$480,2 \pm 179,0$	488,4	484,7

MM indica Michaelis-Menten; LB, Lineweaver-Burk; HW, Hanes-Woolf.

Condições: as reações, em triplicatas, foram realizadas em tampão glicina 200 mM, pH 9,0, 37°C, durante 120 segundos. [rK1] = 3,15 nM

Tabela 3 – Valores das constantes de inibição, K_i e K_{ii} , para a inibição da rK1 pela aprotinina

INIBIDOR	$K_i \pm EP$ (nM)	$K_{ii} \pm EP$ (nM)
Aprotinina	$26,4 \pm 12,0$	$16,9 \pm 8,8$

5. DISCUSSÃO

5.1 Purificação da calicreína tecidual de rato rK1

Purificou-se a rK1 até a homogeneidade. O protocolo de purificação foi constituído de diferentes etapas, a saber: preparação do extrato bruto, cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, seguida da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina e cromatografia de filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.

As atividades amidásicas do extrato bruto e dos materiais eluídos das respectivas cromatografias eram medidas com o substrato Bz-Arg-Nan. Utilizou-se o Trasylol nas determinações de atividade do extrato bruto e do material eluído da coluna de DEAE-Sepharose para eliminar a interferência de outras serino proteases possivelmente presentes na glândula submandibular de rato e que poderiam, também, hidrolisar o Bz-Arg-Nan.

A última etapa da purificação foi a cromatografia de filtração molecular, em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC, do material obtido da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina. O material contendo a rK1, eluída desta cromatografia em FPLC, apresentou um único pico de proteína com o pico de atividade completamente sobreposto ao de proteína (Figura 7), demonstrando a pureza da preparação.

A rK1 foi purificada aproximadamente 32 vezes com um rendimento final de 5%. Justifica-se o baixo rendimento como sendo devido às diferentes etapas executadas no processo de purificação da enzima.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa (1993) para a purificação da calicreína submandibular do rato (rK1). O protocolo de purificação utilizado por

Sousa (1993) constou das seguintes etapas: preparação do extrato bruto, cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose, cromatografia em coluna de Sepharose-aprotinina e cromatografia de troca iônica em coluna mono Q HR 5/5 em equipamento FPLC. O protocolo de purificação da rK1 no presente trabalho foi semelhante ao utilizado por Sousa (1993) nas três primeiras etapas. Na última etapa, foi realizada uma cromatografia de filtração em gel ao invés da cromatografia de troca iônica.

Sousa (1993) iniciou a sua purificação com 41,3 mg de proteínas no extrato bruto e obteve 0,45 mg de calicreína purificada. No presente trabalho, iniciou-se a purificação com 143,6 mg de proteínas no extrato bruto e obteve-se 0,10 mg de rK1 purificada.

Sousa (1993) avaliou as atividades amidásicas nas diversas etapas do protocolo de purificação com o substrato N α -acetil – L-fenilalanil – L-arginina – 4-nitroanilida (Ac-Phe-Arg-Nan) enquanto que no presente trabalho utilizou-se o Bz-Arg-Nan. Segundo Sousa et al. (1996), o parâmetro cinético k_{cat}/K_m da rK1 com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan é 36 vezes maior do que com o substrato Bz-Arg-Nan, sendo portanto, o substrato Ac-Phe-Arg-Nan melhor do que o Bz-Arg-Nan. Assim, não se pode comparar os resultados de atividades amidásicas específicas e totais dos dois trabalhos.

O fator de purificação obtido por Sousa (1993) foi de 5,2 vezes, enquanto que o fator de purificação obtido no presente trabalho foi de 32 vezes.

Os rendimentos finais dos dois processos de purificação foram semelhantes, 6% no trabalho de Sousa (1993) e 5% no presente trabalho.

5.2 Critérios de pureza e peso molecular

A cromatografia da rK1 na coluna de Superose 12HR 10/30 apresentou um único pico de proteínas e sobreposto a ele, um único pico de atividade amidásica (Figura 7).

A eletroforese da rK1 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente 5-15% mostrou uma banda única correspondendo a uma massa molecular de 28,7 kDa (Figura 8).

El-Thaher et al., (1990) avaliando a massa molecular da calicreína submandibular de rato, purificada por cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex-A50 e de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B, encontraram dois componentes com massas moleculares de 38 e 26 kDa. O primeiro corresponde à enzima glicosilada enquanto que o segundo corresponde à enzima não-glicosilada.

É possível que a rK1 isolada no presente trabalho seja constituída principalmente da forma não-glicosilada, pois a massa molecular da rK1 descrita no presente trabalho, 28,7 kDa, é aproximadamente igual à massa da forma não-glicosilada da calicreína descrita por El-Thaher et al. (1990).

Sousa (1993) purificou a calicreína de glândula submandibular de rato (rK1) e determinou a sua massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS 0,1% e 2-mercaptoetanol, encontrando um valor de 38,6 kDa. Provavelmente, a calicreína tecidual do rato purificada por Sousa (1993) tenha sido a forma glicosilada da enzima. Isso justifica as diferenças observadas nos

valores das massas moleculares das calicreínas purificadas por Sousa (1993) e no presente trabalho (28,7 kDa).

O perfil da espectrometria de massa da rK1 purificada, desnaturada, reduzida e alquilada, mostrou um pico único de massa molecular 28,3 kDa (Figura 9) bem próxima à massa molecular encontrada na eletroforese, 28,7 kDa (Figura 8).

5.3 Inibição da atividade amidásica da calicreína tecidual de rato pela aprotinina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

A hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan pela rK1 seguiu o comportamento cinético descrito por Michaelis-Menten (Figura 11) na faixa de concentração do substrato utilizada (120 a 640 μ M). Observa-se no gráfico a diminuição das velocidades de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela rK1, com o aumento da concentração da aprotinina, evidenciando a inibição da enzima pela aprotinina.

Chagas et al. (1992) purificaram uma calicreína de glândula submandibular do rato (rK1) e estudaram o comportamento cinético desta enzima utilizando vários substratos sintéticos do tipo peptidil-4-Nan, incluindo D-Val-Leu-Arg-Nan, Ac-Phe-Arg-Nan e Ac-Leu-Arg-Nan, entre outros. Os autores publicaram que as hidrólises dos substratos peptidil-4-Nan pela rK1 seguiram a cinética de Michaelis-Menten em toda a faixa de concentração dos substratos utilizada.

Por outro lado, Sousa et al. (1996) publicaram que as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan, Ac-Phe-Arg-Nan e Ac-Leu-Arg-Nan não seguiram a cinética de Michaelis-Menten, apresentando um modelo bifásico devido a um desvio para baixo da linha hiperbólica nas mais altas concentrações dos substratos, caracterizando a inibição por excesso de substrato.

O gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 12), confirma a inibição observada na figura anterior e indica que a inibição é do tipo competitiva, uma vez que as retas convergem-se para um mesmo ponto no eixo das ordenadas ($1/k_{cat}$) indicando que não há variação da constante catalítica (k_{cat}) na presença de concentrações crescentes do inibidor, o que é característico da inibição competitiva.

Segundo Segel (1975), o gráfico dos duplos-recíprocos de Lineweaver-Burk é o mais amplamente utilizado para o diagnóstico primário do tipo de inibição enzimática. Entretanto, segundo o mesmo autor, o uso deste gráfico tem sido criticado em dois pontos: primeiro, os aumentos crescentes da concentração do substrato, que geram pontos igualmente espaçados no gráfico de Michaelis-Menten, não produzem pontos igualmente espaçados no gráfico dos duplos-recíprocos. Por exemplo, valores relativos de $[S]$ iguais a 1, 2, 3, e assim por diante, geram valores no gráfico dos duplos-recíprocos que tenderão a se agrupar próximo ao eixo das ordenadas ($1/v$). Portanto, existirão poucos pontos nos valores maiores da escala de $1/[S]$, e estes são os pontos que têm um maior peso no ajuste visual subjetivo da reta. A segunda e mais importante crítica é que pequenos erros na determinação da velocidade são amplificados quando os recíprocos são calculados. Erros na determinação da velocidade são mais significativos em baixas concentrações do substrato (e baixos valores de v). Um

ou dois pontos ruins em altos valores de $1/v$ e $1/[S]$ podem gerar erros notáveis nas inclinações das retas.

O gráfico dos duplos-recíprocos, de Lineweaver-Burk, não é a única transformação linear da curva de Michaelis-Menten. Existem gráficos lineares que são mais adequados ou mais confiáveis para se estimar as constantes cinéticas. Por exemplo, o gráfico de Hanes-Woolf, $[S]/v$ versus $[S]$, pode ser mais adequado para dados provenientes de valores igualmente espaçados com o aumento de $[S]$ (SEGEL, 1975).

Para confirmar o tipo de inibição indicado pelo gráfico de Lineweaver-Burk, desenhou-se o gráfico de Hanes-Woolf, $[D\text{-Val-Leu-Arg-Nan}]/v$ versus $[D\text{-Val-Leu-Arg-Nan}]$. Para desenhar este gráfico, a equação de Lineweaver-Burk é rearranjada multiplicando-se ambos os lados por $[S]$, como descrito a seguir:

Equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_{cat}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 19}$$

Multiplicando-se ambos os lados da equação acima por $[S]$:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{k_{cat}} \frac{1}{[S]} [S] + \frac{[S]}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 20}$$

ou

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{k_{cat}} [S] + \frac{K_m}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 21}$$

A equação 21 é a de Hanes-Woolf (SEGEL, 1975).

Observa-se no gráfico de Hanes-Woolf (Figura 13) que as cinco retas são paralelas e, portanto, apresentam cinco valores de intercepto (K_m/k_{cat}). Como os valores de k_{cat}^{ap} são aproximadamente constantes, de acordo com a Tabela 2, os diferentes valores de K_m/k_{cat} são provenientes da variação dos valores de K_m^{ap} , confirmando a inibição do tipo competitiva.

A Figura 14 confirma esta observação.

De acordo com Plowman (1972), a inibição competitiva pode ser linear, parabólica ou hiperbólica. Entretanto, segundo este mesmo autor, quando se usa o termo competitivo simplesmente, assume-se que a inibição competitiva é do tipo linear. Para se distinguir os três tipos de inibição competitiva é necessário desenhar um gráfico das inclinações das retas obtidas no gráfico dos duplos-recíprocos *versus* a concentração do inibidor. O resultado pode ser uma reta, parábola ou hipérbole indicando o tipo de inibição competitiva como linear,

parabólica ou hiperbólica, respectivamente. A equação de Lineweaver-Burk aplicada a este trabalho é:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_m [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})]}{k_{cat}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{Eq. 22}$$

$$\text{Inclinação} = \frac{K_m [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})]}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 23}$$

$$\text{Inclinação} \times k_{cat}/K_m = 1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii}) \quad \text{Eq. 24}$$

Uma análise semelhante pode ser obtida a partir dos dados de Michaelis-Menten, onde:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_m^{ap} + [S]} \quad \text{Eq. 25}$$

$$K_m^{ap} = K_m \cdot [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})] \quad \text{Eq. 26}$$

$$K_m^{ap} / K_m = [1 + [I]/K_i + [I]^2 / (K_i \cdot K_{ii})] \quad \text{Eq. 27}$$

Os valores de K_m^{ap} em função das concentrações de aprotinina (Figura 14) foram submetidos à análise estatística pelo Programa Graph Pad e não confirmaram que a parábola era estatisticamente significativa. Com o objetivo de se verificar a significância da parábola, decidiu-se redesenhar o gráfico, locando-se na ordenada os valores de K_m^{ap}/K_m obtidos a partir dos gráficos de Michaelis-Menten,

Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf *versus* as concentrações de aprotinina (Figura15). A análise estatística desses dados pelo programa Graph Pad revelou que a parábola obtida era estatisticamente significativa.

Este resultado confirmou que inibição competitiva da rK1 pela aprotinina é do tipo parabólica.

Estes resultados são consistentes com o modelo cinético proposto, em que a aprotinina liga-se a rK1 no seu sítio ativo formando um complexo binário (EI) e, também, liga-se a um segundo sítio de ligação, formando um complexo ternário (IEI). Do mesmo modo, Miranda (1995) reportou que a calicreína urinária humana (hK1) e a aprotinina formam, também, complexos binário e ternário, constituídos de uma ou duas moléculas de aprotinina ligadas a uma molécula de hK1, respectivamente.

Os valores dos parâmetros cinéticos K_i e K_{ii} foram determinados a partir dos valores de K_m e K_m^{ap} obtidos do gráfico de Michaelis-Menten. A partir da regressão quadrática (Eq. 17) foram obtidos os valores das duas constantes de inibição K_i ($26,4 \pm 12,0$ nM) e K_{ii} ($16,9 \pm 8,8$ nM).

Como pode ser observado, K_i e K_{ii} não apresentam diferenças estatisticamente significativas em seus valores. Portanto, não se pode avaliar o grau de afinidade dos sítios de ligação da rK1 às respectivas moléculas de aprotinina.

A comparação entre os valores de K_i para as inibições, pela aprotinina, da hK1 (16,20 nM) e da rK1 (26,4 nM), revela que, possivelmente, a aprotinina interage com a mesma afinidade com o subsítio S1 do centro ativo da hK1 e com o subsítio S1 do centro ativo da rK1. Ao contrário, a comparação dos valores de K_{ii}

para as inibições, pela aprotinina, da hK1 (1,10 nM) e da rK1 (16,9 nM), mostra que o inibidor possivelmente interage melhor com o segundo sítio de ligação da hK1 do que com o segundo sítio de ligação da rK1. Portanto, no presente trabalho não se pode afirmar que o segundo sítio de ligação tenha sido criado ou positivamente modulado pela ligação da primeira molécula de aprotinina ao centro ativo da enzima, como foi descrito por Miranda (1995) em relação à inibição da hK1 pela aprotinina.

O valor de K_m para a rK1 ($104,2 \pm 24,6 \mu\text{M}$), estimado neste trabalho com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, é cerca de 8,5 vezes maior do que o valor de K_m para a hK1 ($12,2 \pm 0,8$), com o mesmo substrato, estimado por Miranda (1995), indicando que a hK1 possui maior afinidade por este substrato.

Os valores de K_m e k_{cat} estimados no presente trabalho, $104,2 \pm 24,6 \mu\text{M}$ e $8642 \pm 572 \text{ min}^{-1}$, respectivamente, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan são aproximadamente semelhantes aos valores de K_m ($68 \pm 10 \mu\text{M}$) e k_{cat} ($5400 \pm 720 \text{ min}^{-1}$) publicados por Chagas et al., (1992) para a rK1 com o mesmo substrato.

Entretanto, os valores de K_m e k_{cat} estimados no presente trabalho são diferentes dos valores de K_m (24 ± 2) e k_{cat} ($31560 \pm 840 \text{ min}^{-1}$) publicados por Sousa et al. (1996) para a rK1 com o mesmo substrato.

Estes resultados sugerem que a rK1 descrita no presente trabalho seja uma forma enzimática semelhante a rK1 descrita por Chagas et al., (1992) e diferente da rK1 descrita por Sousa et al., (1996).

Portanto, estes trabalhos sugerem que a glândula submandibular do rato tem duas diferentes calicreínas teciduais.

A inibição competitiva parabólica descrita neste trabalho é um tipo raro de inibição enzimática.

Assim, Nimmo & Goggins (1981) descreveram a inibição competitiva parabólica competitiva da 3-deoxy-D-*arabino*-heptulose 7-phosphate synthase de *Neurospora crassa* pelo L-triptofano, utilizando como substrato a eritrose-4-fosfato. Os autores concluíram que a inibição é do tipo competitiva parabólica, utilizando o gráfico dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk), que mostrou retas convergentes para um mesmo ponto na ordenada, $1/v$ (competitiva), e o gráfico das inclinações das retas obtidas no gráfico dos duplos-recíprocos *versus* a concentração de triptofano, que mostrou uma parábola (parabólica). Os autores não calcularam os valores das constantes de inibição K_i e K_{ii} .

Rode et al. (1986) demonstraram a inibição competitiva parabólica da timidilato sintetase de tumor de mamífero por 5-etil-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato e 5-propil-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato utilizando como substrato o trimetilfosfato.

Leoncini et al. (1989) reportaram a inibição competitiva parabólica da L-treonina-desidratase de fígado de rato altamente purificada por aminotióis (L-cisteína, D-cisteína e cisteamina), utilizando como substrato a L-treonina. Segundo os autores, a enzima tem dois sítios de ligação para cada um dos inibidores.

Junqueira et al. (1992) publicaram um excelente trabalho descrevendo a inibição competitiva parabólica da α e β -tripsina bovina com os inibidores 4-4'-diazamino-bis-benzamidina (DABB) e 4-4'-diazamino-bis-benzamidina complexada com o cloreto de platina (DABB-PtCl₂), utilizando os substratos Bz-

Arg-Nan, Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan. Os autores calcularam as constantes de inibição (K_{i1} e K_{i2}) para os dois inibidores com os três substratos.

Wu et al. (1993) reportaram a inibição competitiva parabólica da fosfatase do ácido fosfatídico associada à membrana do *Saccharomyces cerevisiae* pela esfingosina, fitoesfingosina e esfinganina, utilizando como substrato o di-oleil-fosfatidato [^{32}P]. Os autores concluíram que a inibição é do tipo competitiva parabólica utilizando os gráficos de Michaelis-Menten (inibição), de Lineweaver-Burk (competição) e o gráfico das inclinações das retas do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* a concentração do inibidor (parabólica). Os autores calcularam os valores de K_i para os três inibidores.

Miranda et al. (1995) reportaram a inibição competitiva parabólica da atividade da calicreína urinária humana (hK1) pela aprotinina utilizando o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan. Os autores concluíram que a inibição é do tipo competitiva parabólica utilizando os gráficos de Lineweaver-Burk (inibição competitiva) e das inclinações dos duplos-recíprocos *versus* a concentração de aprotinina. Os autores calcularam os valores das constantes de inibição K_i e K_{ii} .

Papapostolou et al. (2002) reportaram a inibição competitiva parabólica da atividade semelhante à quimotripsina do proteosoma 26S de ovos de *Xenopus laevis* por peptídeos compostos por 5 ou 6 aminoácidos naturais que mimetizam os produtos gerados durante a digestão de proteínas, utilizando como substratos o t-butil-oxi-carbonil-Gli-Gli-Leu-p-nitroanilida (Boc-GGL-p-NA) e o succinil-Leu-Leu-Val-Tir-4-amido-metil-I-cumarina (Suc-LLVY-AMC). Os autores constataram que a inibição é do tipo competitiva pelo gráfico de Dixon ($1/v$ vs $[I]$) e parabólica pelo

gráfico V_0/V_i vs $[I]$, onde duas moléculas de inibidor estão ligadas à molécula da enzima. Os autores não calcularam as constantes de inibição.

Arsov et al. (2005) reportaram a inibição competitiva parabólica da acetilcolinesterase eritrocitária pelo n-butanol utilizando o substrato acetilcolinaiodada (ATCI). Os autores calcularam apenas uma constante de inibição.

Pelo exposto, pode-se perceber que Junqueira et al. (1992) e Miranda et al. (1995) fizeram um estudo detalhado para a caracterização cinética da inibição competitiva parabólica da α e β -tripsina com os inibidores 4-4'-diazamino-bis-benzamidina (DABB) e 4-4'-diazamino-bis-benzamidina complexada ao cloreto de platina (DABB-PtCl₂) e da hK1 pela aprotinina.

Do mesmo modo, no presente trabalho, fez-se também um estudo aprofundado para caracterizar este tipo raro de inibição, competitiva parabólica, observada entre a rK1 e a aprotinina.

Pelo exposto, pode-se perceber que, dos oito artigos publicados na literatura sobre a inibição competitiva parabólica, dois referem-se a trabalhos executados no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

- A calicreína tecidual do rato (rK1) foi purificada até a homogeneidade a partir do pó de glândulas submandibulares.
- A homogeneidade da rK1 foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente 5-15% contendo SDS 0,1% e por espectrometria de massa.
- A massa molecular, determinada pela eletroforese e pela espectrometria de massa foi 28,7 e 28,3 kDa, respectivamente.
- A concentração da solução estoque de rK1, em centro ativo, determinada pela titulação com aprotinina, foi de 692 nM.
- A concentração da solução estoque de aprotinina, determinada pela sua absorção em 280 nm, foi de 380 nM.
- A hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 seguiu a cinética de Michaelis-Menten em toda a faixa de concentrações utilizada.
- Os parâmetros cinéticos K_m (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf) e k_{cat} (Michaelis-Menten) foram calculados.

- A hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela rK1 foi inibida pela aprotinina, como observado no gráfico de Michaelis-Menten.
- A análise dos dados de inibição da rK1 pela aprotinina, através dos gráficos de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf, revelou uma inibição do tipo competitiva.
- O aprofundamento da caracterização da inibição competitiva, pela análise do gráfico de K_m^{ap}/K_m versus aprotinina, revelou que a inibição competitiva é do tipo parabólica.
- Na inibição competitiva parabólica, duas moléculas de aprotinina se ligam a uma molécula da rK1.
- Os parâmetros cinéticos de inibição K_i e K_{ii} foram calculados, $26,4 \pm 12,0$ e $16,9 \pm 8,8$ nM, respectivamente.
- Os valores de K_i e K_{ii} , aproximadamente iguais, indicam que não há diferença de afinidade dos sítios de ligação da enzima pelo inibidor.
- A inibição competitiva parabólica é um tipo raro de inibição enzimática.
- A inibição da rK1 pela aprotinina teve um comportamento cinético semelhante ao da inibição da calicreína tecidual humana (hK1) pela aprotinina com o mesmo

substrato (Inibição Competitiva Parabólica), indicando que as duas calicreínas teciduais apresentam propriedades cinéticas semelhantes.

7. PERSPECTIVAS

A inibição competitiva parabólica observada neste trabalho indica a existência de dois sítios de ligação para o inibidor na molécula da rK1. Um desses sítios é o subsítio S1 do centro ativo da enzima. O outro sítio não está definido até o presente momento. Um trabalho de pesquisa interessante consistirá na identificação do segundo sítio da rK1. Uma das alternativas para se fazer essa identificação é a preparação de uma grande quantidade da rK1, inibi-la com a aprotinina, cristalizar o complexo enzima-inibidor e realizar estudos de difração de raios-X neste complexo. Uma segunda alternativa é realizar estudos de inibição da rK1 com 4-4'-diazamino-bis-benzamidina (DABB), também conhecida como berenil, para verificar se este composto inibe a enzima e se esta possível inibição é do tipo competitiva parabólica. Se confirmada, inibir uma grande quantidade de rK1 com o berenil, cristalizar o complexo e submetê-lo a estudos de difração de raios-X.

Para se obter uma grande quantidade de rK1, a melhor alternativa será prepará-la por engenharia genética, com a inserção do DNA da rK1 no DNA de um microorganismo que, sendo cultivado em grande escala, produzirá uma grande quantidade de rK1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARSOV, Z.; ZORKO, M.; SCHARA, M. Inhibition of erythrocyte acetylcholinesterase by n-butanol at high concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v, 437, p. 78-84, 2005.

ASHLEY P.I.; MACDONALD R.J.; Tissue-specific expression of kallikrein related genes in the rat. *Biochemistry*, v.22 p. 4520-4527, 1985.

ASHLEY P.I.; MACDONALD R.J. Kallikrein-related mRNAs of the rat submaxillary gland: nucleotide sequences of four distinct types including tonin. *Biochemistry*, v. 24, p. 4512-4520, 1985.

BECKMANN, J. ; MEHLICH, A. ; SCHORÖDRE, W. ; WENZEL, H. R. ; TSCHESCHE, H. Preparation of chemically mutated aprotinin homologues by semisynthesis. *European Journal of Biochemistry*, v.176 p. 675-682, 1988.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacological Reviews*, v.44, p. 1-80,1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRINKMANN, T.; SCHNIERER, S.; TSCHESCHE, H. Recombinant aprotinin homologue with new inhibitory specificity for cathepsin G. *European Journal of Biochemistry*, v.202, p. 95-99, 1991.

CHEN, C.C.; WANG, S.S.; LEE, F.Y. Action of Antiproteases on the Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. *Journal of Pâncreas*, 8 (4 Suppl.): 488-494, 2007.

CHAGAS, J. R.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; XIONG, W.; WANG, C.; CHAO, J.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Substrate Specificities of Tissue Kallikrein and T-Kininogenase: Their Possible Role in Kininogen Processing. *Biochemistry*, v. 31, p. 4969-4974, 1992.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators. In: CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. 2^a Edition. London: Butterworths, 1981. Cap. 5., p. 73-98.

DIAMANDIS, E.P.; YOUSEF, G.M. Human tissue kallikrein: a family of new cancer biomarkers. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 1198-1205, 2002.

EL-THAHER, T. S.; SAED, G. M.; BAILEY, G.S. A simple and rapid purification of kallikrein from rat submandibular gland. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1034, 157-161, 1990.

ERDOS, E.G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, V.15(SUPPL.6), P. 520-524, 1990.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W.; The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 95, p. 271-278, 1961.

GEIGER, R., STUCKTEDTE, U., FRITZ, H. Isolation and characterization of human urinary kallikrein. *Z. Physiol. Chem.*, v .361, p. 1003-1016, 1980.

GONTIJO, D.T.A. Caracterização cinética da caliceína tecidual do rato (rKI) com os inibidores da tripsina: benzamidina, 4-aminobenzamidina e 4-nitrobenzamidina. 2005. 125 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005).

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Histamina, Bradicinina e seus antagonistas. In: _____. Tratado de fisiologia médica. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 25, p.495-498.

GREENE, L.J.; RIGBI, M.; FACKRE, O. S. Trypsin Inhibitor from bovine pancreatic juice. *The Journal of Biological Chemistry*, v.241, p. 5610 – 5618, 1966.

HAYASHI, I.; KATO, H.; IWANAGA, S.; OH-ISHI, S. Rat plasma high-molecular-weight kininogen. *The Journal of biological chemistry*, v. 260, p.6115-6122, 1985.

HECQUET, C.; TAN, F.; MARCIC, B. M.; ERDÖS, E. G.; Human Bradykinin B₂ receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Molecular Pharmacology*, v. 58, p. 828-836, 2000.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 25, p. 873-887, 1992.

KUNITZ, M.; NORTHROP, J. H.; Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *Journal of General Physiology*, v. 19, p. 991-1007, 1936 apud FRITZ, H.; FINK, E.; TRUSCEIT, E. Kallikrein inhibitors. *Federation proceedings*, v. 38, p. 2753-2759, 1979.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

LEONCINI, R.; PAGANI, R.; MARINELLO, E.; KELETI, T. Double inhibition of L-threonine dehydratase by aminothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 994, p. 52-58, 1989.

MARES-GUIA, M.; DINIZ C.R. The active center of the kallikreins. In: ERDOS, E.G. (ED). Bradykinin, kalidin and kallikrein: Berlin: Spring-Verlag, 1970. P. 141-145. (Handbook of Experimental Pharmacology, 25).

MASON, A.J.; EVANS B.A.; COX D.R.; SHINE J.; RICHARDS R.I. Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature*, v. 3003, p. 300-307, 1983.

MIRANDA, T. L. S. Estudos com a calicreína urinária humana. A – Um novo método para purificação da enzima em larga escala; B – Caracterização cinética com substratos sintéticos dos tipos amida e ester, derivados da arginina N α -substituída e com os inibidores aprotinina e benzamidina. 1995.169 f. (Tese de Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1995.

MIRANDA, T.L.S.; RAMOS,C.H.I.; FREIRE, R.T.S.; SOUZA, E.P.; ROGANA, E.; SANTORO, M.M., FIGUEIREDO, A.F.S. Kinetic mechanism of the inhibition of human urinary kallikrein by basic pancreatic trypsin inhibitor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.28, p. 505-512, 1995.

MOREAU, M.E. ; GARBACKI, N. ; MOLINARO, G. ; BROWN, N. J. ; MARCEAU F. ; ADAM A. The kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *Journal of Pharmacological Science*, v. 99, p. 6-38 2005.

MULLER-ESTERL, W.; RAUTH, G.; LOTTSPREICH, F.; KELLERMENN, J.; HENSCHEN, A. Limited proteolysis of human low-molecular-mass kininogen by tissue kallikrein. *European Journal of Biochemistry*, v. 149, p. 15-22, 1985.

MULLER-ESTERL, W.; IWANAGA, S.; NAKANISHI, S. Kininogens revisited. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 11, p. 336-339, 1988.

NIMMO, G. A.; COGGINS, J. R. Some kinetic properties of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Neurospora crassa*. *Biochemical Journal*, v. 199, p.657-665, 1981.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262, 1988.

ORSTAVIK, T. B.; CARRETERO, O. A.; HAYASHI H.; SCICLI G.A.; JOHANSEN L. Immunohistochemical localization of tonin and its relation to kallikrein in rat salivary glands. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 30, p. 1123-1129, 1982.

PAPAPOSTOLOU, D.; COUX, O.; RAVAUX, M.R. Regulation of the 26S proteasome activities by peptides mimicking cleavage products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 295, p. 1090-1095, 2002.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. *Methods in Enzimology*, v. 91, p. 95-119, 1983.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567, 1999.

PINTIGNY, D.; DACHARY-PRIGENT, J.; Aprotinin can inhibit the proteolytic activity of thrombin. *European Journal of Biochemistry*, v. 207, p. 89-95, 1992.

PLOWMAN, K.M. Inhibitor studies, In: HUMMEL D.N.; STORK, G.; KING, E.L.; HERSCHBAECH D.R.; PÓPLE, J.A. (Editors), *Enzyme kinetics*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1972. Cap. 3, p.56-75.

RICHARDS, R.I.; CATANZARO, D.M.; MASON A.J.; MORRIS, B.J.; BAXTER T.D.; SHINE J. Mouse glandular kallikrein genes. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for a member of the kallikrein arginine esteropeptidase group of serine proteases. *J. Biol. Chem*, v. 257, p. 2758-2761, 1982.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*, v. 156, p.261-273, 1949.

RODE W.; KULIKOWSKI, T.; KEDZIERSKA, B.; SHUGAR, D. Inhibition of mammalian tumour thymidilate sintetase por análogos de 2'-desoxiuridina 5'-fosfato. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, v. 12, p. 545-549, 1986.

SCHACHTER, M. Kallikrein (kininogenases) – A group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, v. 31. n.1, p. 1-17, 1980.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 27, n. 2, p.157-162, 1967.

SEGEL, I. H. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme-systems*. New York: John Wiley & Sons, 1975. p. 161-226.

SOUSA, M. O. Caracterização cinética da caliceína de glândulas submandibulares de rato com substratos sintéticos $N\alpha$ -derivados da arginina e inibidores naturais e sintéticos. 1993. 166 f. (Dissertação mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1993.

SOUSA, M. O.; RODRIGUES, C. V.; PENA, H. B.; ALVARENGA, M. G.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; SANTORO, M. M.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; FIGUEIREDO, A. F. S. Kinetic characterization of rat tissue kallikrein using $N\alpha$ -substituted arginine 4-nitroanilides and $N\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester as substrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 327-334, 1996.

STONE, K.L., WILLIAMS, K.R. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gel. In: Walker, J.M. (ed), *The protein protocol handbook*. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp. 415-421.

STRYER, L. Zymogen activation: Digestive enzymes and clotting factors, in Stryer, L. *Biochemistry*. 2^a Edition. San Francisco: W. H. Freeman and company, 1981. Cap. 8, p. 157-181.

WEBSTER, M.E. Kallikrein in glandular tissue. In: ERDOS, E.G. (ED). *Bradykinin, kalidin and kallikrein*: Berlin: Springer-Verlag, 1970. P. 324-350. (Handbook of Experimental Pharmacology, 25).

WESTERMEIER, R. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. Third edition. Wiley-vch verlag-gmbh, Weinheim, 2001.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. *Proteomics in Practice: A Laboratory manual of proteome analysis*. Wiley-vch verlag-gmbh, Weinheim, 2002.

WOLF, W. C.; EVANS, D. M.; CHAO, L.; CHAO, J. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *American Journal of Pathology*, v. 159, p. 1797-1805, 2001.

WU, W.; LIN, Y.; WANG, E.; MERRIL, A. H.; JR; CARMAN, G. M. Regulation of phosphatidate phosphatase activity from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by sphingoid bases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 13830-13837, 1993.

YOUSEF, G.M.; CHANG, A.; SCORILAS, A.; DIAMANDIS, E. P. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3 – q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 125-133, 2000.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 2, p. 184-204, 2001.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biological Chemistry*, v. 383, n. 7-8, p. 1045-1057, 2002.

YOUSEF G.M; KOPOLOVIC, A.D; ELLIOTT, M.B; DIAMANDIS, E.P. Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 305, p. 28-36,2003.

YOUSEF G.M; DIAMANDIS, E.P. An overview of the gene families in humans as other species: emerging candidate tumor markers. *Clinical Biochemistry*, v.36, p.443-452, 2003.